JUSTUS LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE.

HERAUSGEGEBEN VON

H. WIELAND

BAND 541.

MIT 23 FIGUREN IM TEXT

1939

VERLAG CHEMIE, G. m. b. H., BERLIN

JUSTUS LIEBIGS
ANNALEN DER CHEMIE

541. Band

Glucoside der Isäthionsäure und ihres Äthylesters.

Über Emulsin. XL[1]);

von *B. Helferich* und *H. Lutzmann*.

[Aus dem chemischen Laboratorium der Universität Leipzig.]

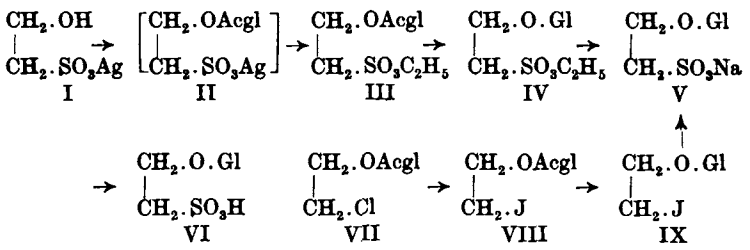
(Eingelaufen am 27. Juli 1939.)

Vor einiger Zeit[2]) haben wir über die quantitative Spaltung der Glucoside von Phenolcarbon-säuren durch Fermente und über ihre Selbstspaltung berichtet. Im Anschluß daran haben wir nach anderen Glucosiden von Oxysäuren gesucht, die, ähnlich wie die Glucosido-salicyl-säure, in wäßriger Lösung einer Selbstzersetzung unterliegen. Als einfaches Beispiel dafür schien uns besonders interessant die Glucosido-isäthionsäure (VI), um festzustellen, ob in einem glucosidischen Derivat die unmittelbare Nachbarschaft der Sulfonsäuregruppe zur glucosidischen Bindung eine Zersetzlichkeit dieser Bindung in wäßriger Lösung zur Folge hat.

Die Synthese wurde zunächst ausgehend von der Isäthionsäure selbst durchgeführt, so wie es die Formeln I—VI erkennen lassen.

Besonderen Wert haben wir darauf gelegt, nach der Kupplung des isäthionsauren Silbers mit Acetobromglucose denjenigen Anteil weiter zu verarbeiten, der stark sauer war, der demnach zur Bildung eines Silbersalzes (II) befähigt war und der daher die Glucosido-gruppe sicher am alkoholischen Hydroxyl und nicht etwa an der Sulfonsäure-gruppe enthielt.

[1]) Nr. XXXIX vgl. H. **261**, 55 (1939).
[2]) A. **537**, 11 (1938).



Acgl = Tetracetyl-β-d-glucosido- . Gl = β-d-Glucosido- .

Die so hergestellte freie Glucosido-isäthionsäure (VI) ebenso wie ihr Natriumsalz (V) erwiesen sich als normale Glucoside. Eine Abspaltung von Glucose (nachweisbar durch Reduktion Fehlingscher Lösung) tritt erst durch Säurehydrolyse ein. Die eigene starke Acidität der freien Glucosidosäure genügt bei Zimmertemperatur, ja selbst bei der Temperatur des siedenden Chloroforms (wenn die Konzentration nicht zu hoch ist) nicht, um eine Spaltung der benachbarten Glucosidogruppe herbeizuführen. Demzufolge kann auch die Selbstzersetzung der Glucosido-salicylsäure nicht allein auf die (ja viel geringere) Acidität der benachbarten Carboxylgruppe zurückgeführt werden.

Um so überraschter waren wir, daß im Äthylester der Glucosido-isäthionsäure (IV), die glucosidische Bindung, sehr alkaliempfindlich ist, so stark, daß dieser Glucosido-ester *ohne* vorhergehende Säurehydrolyse Fehlingsche Lösung direkt reduziert.

Dieses unerwartete Resultat veranlaßte uns, die Synthese der in Frage kommenden Substanz auf einem grundsätzlich anderen zweiten Wege durchzuführen, der aus den Formeln VII—IX—V hervorgeht.

Nach diesem zweiten Synthesengang ist es noch sicherer, daß in den erhaltenen Glucosiden die Glucose wirklich am alkoholischen Hydroxyl-sauerstoff gebunden ist. Das Ergebnis dieser Synthese war in jeder Beziehung mit dem des ersten Weges identisch: Wieder erwies sich die Glucosido-isäthionsäure in der eigenen stark sauren Lösung bei nicht zu hoher Konzentration als bemerkenswert beständig, ebenso wie in der Lösung ihrer Salze. Fehlingsche Lösung wird nicht

reduziert, Glucose wird erst durch kräftige Säurehydrolyse bei hoher Temperatur abgespalten. Dagegen reduzieren der Glucosido-isäthionsäure-äthylester ebenso wie sein Tetracetylderivat Fehlingsche Lösung in der Siedehitze direkt, *ohne* vorangegangene Säurehydrolyse.

Die Glucosid-bindung im Glucosido-ester ist so alkaliempfindlich, daß in wäßrig-alkalischer Lösung der Zucker zum Teil vor der Estergruppe abgespalten wird. Mit 0,2 Mol $^{n}/_{100}$-Natronlauge tritt dabei nach Abspaltung von nicht ganz 50 Proc. der Glucose (nach 5 Stunden bei Zimmertemperatur) ein Stillstand ein, weil das Alkali durch die allmählich entstehende freie Isäthionsäure neutralisiert wird.

Mit 1 Mol $^{n}/_{20}$-Alkali gelang es so gut wie zu 100 Proc. die Glucose abzuspalten. Dieser Vorgang wurde sowohl polarimetrisch verfolgt, als auch durch Abscheidung der Glucose als Phenylosazon bestätigt.

Der Versuch einer theoretischen Erklärung für die unerwartete und merkwürdige Tatsache, daß die Glucosidbindung in der *freien* Glucosido-isäthionsäure normal und alkali-unempfindlich ist, durch *Veresterung* der Sulfonsäure-gruppe aber stark alkali-empfindlich wird, sei fürs erste zurückgestellt. Es sind Versuche im Gange, zu entscheiden, ob und in welchem Ausmaße diese Erscheinung auch bei einer größeren Entfernung der Sulfonsäuregruppe von der Glucosidbindung bestehen bleibt.

Die Frage, warum bei der fermentativen Spaltung eines Glucosids in der Ferment-Substrat-Verbindung die Glucosidbindung unter den milden Bedingungen des p_H und der Temperatur hydrolysierbar wird, ist noch ungewiß[1]). Das Studium labiler, leicht hydrolysierbarer Glucoside als Modelle, auch für die Fermenthydrolyse, scheint uns daher wertvoll. In dieser Richtung liefert die vorliegende Arbeit einen neuen, unerwarteten und daher interessanten Beitrag durch die Entdeckung der *Alkali-empfindlichkeit* des Glucosido-isäthionsäure-äthylesters, zumal da vereinzelt auch manche Carbohydrasen

[1]) M. Bergmann, Schotte u. Lechinsky, B. **55**, 158 (1922).

im alkalischen Medium das Optimum ihrer Wirksamkeit haben[1]).

Die in dieser Arbeit hergestellten β-d-Glucoside wurden auf ihre Spaltbarkeit durch Süßmandelemulsin geprüft. Wie aus Tab. 3 am Schluß der Arbeit hervorgeht, ist ein sehr bemerkenswerter und großer Unterschied zwischen der Spaltbarkeit des β-d-Glucosido-isäthionsäure-*esters* (Wertigkeit 0,32) und der freien Glucosido-*säure* (Wertigkeit nur 0,0009) festzustellen, wieder ein gutes Beispiel dafür, daß das Auftreten von Ionen-ladungen im Glucosid die Fermentspaltung erheblich stört.

Weiter ist bemerkenswert, daß — im Gegensatz zu den Halogenen in 6-Stellung der Glucose — bei den β-d-Glucosiden der drei Äthylen-halohydride das Jod-hydrin am schnellsten, das Chlorhydrin am langsamsten fermentativ gespalten wird.

Versuche.

Isäthionsaures Silber (I)[2]).

Als Ausgangsmaterial diente eine technische Lösung von Natrium-isäthionat, für deren Überlassung wir der I. G. Farbenindustrie Akt.-Ges., Werk Wolfen, zu großem Dank verpflichtet sind. Durch Verdünnen dieser Lösung mit etwa $^1/_2$ Volumen Wasser, Klären mit Kohle und Kieselgur, Eindampfen der klaren Lösung unter vermindertem Druck bis zur starken Krystallisation, Auflösen der entstandenen Krystalle durch Erwärmen und Wieder-abscheiden durch Abkühlen wurde *Natrium-isäthionat* gewonnen. 50 g dieses Salzes wurden durch Lösen in einem Gemisch von 90 ccm Wasser und $1^1/_2$ Liter gewöhnlichem Äthylalkohol, Abkühlen und Zusatz von $1^1/_4$ Liter Aceton umkrystallisiert. Das so gewonnene reine Salz ist in Wasser sehr leicht, in Methanol ziemlich leicht löslich.

Eine Lösung von 30 g dieses Salzes in 30 ccm Wasser wird bei 0° mit 60 ccm Salzsäure ($d = 1{,}19$) versetzt, dann $^1/_2$ Liter Aceton zugegeben und nach $^1/_2$ Stunde Aufbewahren bei niedriger Temperatur das Kochsalz (11,7 g, das ist die theoretische Menge) abgesaugt. Die Lösung hinterläßt nach dem Eindampfen i. V. einen öligen, trüben Rückstand, der durch mehrmaliges Aufnehmen mit Wasser, Klären mit Kohle und Eindampfen unter vermindertem Druck die *freie Isäthionsäure* in langen, farblosen,

---

[1]) Darm-saccharase, vgl. Oppenheimer, Die Fermente, 5. Aufl., Bd. I, 570: Amylase im Säugetier-blut; T. Groll, Arch. Néerl. Physiolog. 9, 520 (1924).

[2]) N. Stempnewski, B. **15**, 947 (1882).

sehr hygroskopischen Nadeln liefert. Die so gewonnene Säure läßt sich mit Natronlauge und Phenolphtalin als einbasische Säure titrieren[1]).

Eine Lösung von 26 g reiner Isäthionsäure (1 Mol.) in 50 ccm Wasser wird mit 28,5 g Silbercarbonat (theoretische Menge) geschüttelt, die entstandene Lösung nach Klären mit Kohle i. V. eingedampft und so das *isäthionsaure Silber* in fast theoretischer Ausbeute (46,7 g) als weiße Krystallmasse gewonnen. Zur Reinigung wurden 90 g dieses Silbersalzes mit gewöhnlichem Alkohol im Mörser verrieben und der Brei portionsweise in ein siedendes Gemisch von $1^1/_4$ Liter gewöhnlichem Alkohol und 50 ccm Wasser eingetragen. Die Lösung wurde mit Kohle geklärt, auf etwa 40° abgekühlt und mit $^1/_2$ Liter Aceton versetzt. Dabei schied sich (wenn möglich, impfen!) das isäthionsaure Silber in farblosen Nadeln ab. Aus der Mutterlauge läßt sich durch weiteren Zusatz von 3 Liter Aceton eine zweite Krystallisation abscheiden. Ausbeute zusammen 78 g. Das Salz ist lichtempfindlich und sehr hygroskopisch. Es ist sehr leicht löslich in Wasser, noch ziemlich löslich in kaltem Methanol und Pyridin, in Äthanol nur noch sehr wenig. Die bei 56° über Phosphor-pentoxyd unter vermindertem Druck konstant getrocknete Substanz schmilzt bei 110° (korr.).

5,203 mg Subst.: 2,069 mg CO_2, 1,051 mg H_2O. — 3,362 mg Subst.: 4,194 mg Benzidinsulfat. — 5,170 mg Subst.: 3,181 mg AgCl.

$C_2H_5O_4SAg$ (232,98)

Ber.	C 10,30	H 2,16	S 13,76	Ag 46,30
Gef.	„ 10,84	„ 2,26	„ 14,17	„ 46,31.

Tetracetyl-β-d-glucosido-isäthionsäure-äthylester (III).

10 g unter absolutem Benzol verriebenes Silber-isäthionat (1 Mol.) wurden portionsweise unter Umschütteln bei möglichst vollständigem Ausschluß von Wasser innerhalb 20 Minuten in eine 50° warme Lösung von 17,6 g Acetobromglucose (1 Mol.) in 75 ccm absolutem Benzol zugegeben. An Stelle des farblosen Silber-isäthionats tritt sofort gelbes Bromsilber. Das Reaktionsgemisch reagiert nach weiteren 10 Minuten (im Wasserbad von 50°) stark kongosauer. In die auf Zimmertemperatur abgekühlte Mischung wurden 17,8 g mit absolutem Benzol verriebenes Silbercarbonat (1,5 Mol.) eingetragen und 20 Minuten im Dunkeln unter zeitweiligem kräftigem Schütteln aufbewahrt. Das Reaktionsgemisch färbt sich dabei, unter starker Kohlendioxydentwicklung, braun und reagiert zum Schluß nur noch schwach lackmus-sauer.

[1]) M. A. Astruc, C. r. **130**, 1563 (1900).

Durch Zusatz von 400 ccm absolutem Äther wurde eine braune, flockige Substanz, das Silbersalz der Tetracetyl-β-d-glucosido-isäthionsäure (II), gefällt. Sie wurde zusammen mit dem Gemisch der anderen Silbersalze abgesaugt und mit etwa 50 ccm absolutem Äther ausgewaschen. Der Niederschlag wurde 10 Minuten lang im Dunkeln mit 350 ccm absolutem Aceton ausgeschüttelt. Dabei geht das tetracetyl-β-d-glucosido-isäthionsaure Silber (II) in Lösung. In dieser Lösung (die von den ungelösten Silbersalzen nicht getrennt zu werden braucht) setzt es sich im Verlauf von 2 Stunden mit 13,5 g Äthyljodid (2 Mol.) zu dem Äthylester und Jodsilber um. Die nunmehr abfiltrierte, farblose Lösung wird i. V. bei höchstens 35° Badtemperatur bis zur Trockne verdampft, der gelbliche, schwach kongosauer reagierende Rückstand wurde mit Wasser und etwas festem Natriumbicarbonat verrieben (um die Säure unschädlich zu machen). Er krystallisiert dabei im Verlauf einiger Stunden im Kühlschrank. Ausbeute an Rohprodukt 12,1 g (das ist 58 Prod. d. Th.).

Zur Reinigung wird die Substanz in 2—3 Teilen absolutem Alkohol oder in 40 Teilen Aceton gelöst und durch Zusatz von 100 Teilen Wasser wieder ausgefällt. Die Krystalle zeigen die Löslichkeit der Acetylglucoside. In Äther sind sie ziemlich schwer löslich. Unerwarteterweise reduziert die Substanz Fehlingsche Lösung in der Hitze sofort. Die Verbindung ist nicht beliebig haltbar, auch nicht im verschlossenen Gefäß. Sie schmilzt bei 125° (korr.).

3,888 mg Subst.: 6,393 mg CO_2, 2,012 mg H_2O. — 5,755 mg Subst.: 3,307 mg Benzidinsulfat.

$C_{18}H_{28}O_{13}S$ (484,28)	Ber.	C 44,60	H 5,83	S 6,62
	Gef.	„ 44,84	„ 5,79	„ 6,53.

$[\alpha]_D^{19} = -1{,}11^0 \cdot 4{,}491 / 2 \cdot 0{,}1098 \cdot 1{,}472 = -15{,}4^0$ (in Chloroform).

In wenig Aceton mit überschüssiger wäßriger Kalilauge wird die Substanz im Laufe von 15 Stunden bei Zimmertemperatur entacetyliert und die Estergruppe verseift. Dabei werden, wie erwartet, 5 Äquivalente Lauge neutralisiert. Aber auch diese Lösung reduziert Fehlingsche Lösung in der Hitze. (Abspaltung von Glucose, vgl. unten.)

β-d-Glucosido-isäthionsäure-äthyl-ester (IV).

Die Entacetylierung (nach Zemplen[1]) ist weiter unten ausführlich beschrieben.

Der Glucosido-ester schmilzt bei 89° (korr.), ist leicht löslich in Wasser, Aceton und Alkohol, nur wenig löslich in kaltem Essigester, schwer bis unlöslich in Chloroform, Petroläther. Er reduziert Fehlingsche Lösung in der Hitze!

4,572 mg Subst.: 6,369 mg CO_2, 2,514 mg H_2O. — 3,987 mg Subst.: 3,570 mg Benzidinsulfat.

$C_{10}H_{20}O_9S$ (316,22)	Ber.	C 37,95	H 6,37	S 10,14
	Gef.	„ 37,99	„ 6,15	„ 10,17.

$[\alpha]_D^{21} = -0{,}92° \cdot 3{,}057 / 2 \cdot 0{,}058 \cdot 1{,}006 = -24{,}1°$ (in Wasser).

Die Substanz ist nicht lange haltbar und zersetzt sich beim Aufbewahren unter Säurebildung. Wasser spaltet in der Kälte langsam, in der Hitze rasch den Ester in Alkohol und Glucosidosäure. Die dann kongosaure Lösung reduziert Fehlingsche Lösung nicht mehr direkt, sondern erst nach der Hydrolyse mit Säuren!

Die Spaltung des Glucosido-isäthionsäure-esters durch *Alkali* ist weiter unten ausführlich beschrieben.

β-d-Glucosido-isäthionsäure (VI).

Die Substanz konnte nicht isoliert werden. Ihre wäßrige Lösung entsteht aus der wäßrigen Lösung des Esters (etwa $^n/_{30}$) im Laufe mehrerer Wochen bei Zimmertemperatur. Dabei geht das p_H von anfangs 5,1 bis auf etwa 1,7 herunter (nach 29 Tagen), während sich für die freie Säure bei vollständiger elektrolytischer Dissoziation 1,5 berechnen würde. Die Drehung ändert sich dabei von $-0{,}52$ bis auf $-0{,}66°$. Aus der Tatsache, daß die Drehung nicht positiv wird, ist ersichtlich, daß keine Glucose abgespalten wird. Selbst nach 8-stündigem Erhitzen dieser Lösung in siedendem Chloroform wurde keine Drehungsänderung, demnach keine Spaltung der Glucosidbindung, beobachtet; auch jodometrisch wurde keine freie Glucose nachgewiesen. Die freie β-d-Glucosidosäure ist demnach im Gegensatz zu ihrem Äthylester ein in wäßriger Lösung sehr stabiles Glucosid.

[1]) Ber. 59, 1258 (1926).

Die Entstehung der freien Säure aus dem Ester läßt sich durch Erhitzen der wäßrigen Lösung des Esters auf dem Wasserbad in 20 Minuten praktisch vollständig durchführen. Auch diese Lösung dreht negativ und nicht positiv! Aus den beobachteten Werten läßt sich die spezifische Drehung der freien Säure in Wasser und nach Zusatz von Kaliumcarbonat (etwa 7 Proc.) auch in schwach alkalischer Lösung bestimmen, ohne daß die Substanz isoliert wird. Fehlingsche Lösung wird auch von dieser Lösung erst nach der Hydrolyse mit Salzsäure reduziert.

$[\alpha]_D^{18} = -0{,}66^0 \cdot 3 / 2 \cdot 0{,}0288 = -34{,}4^0$ (in Wasser).
$[\alpha]_D^{17} = -0{,}35^0 \cdot 3 / 1 \cdot 0{,}0288 = -36{,}5^0$ (in Pottaschelösung von 7 Proc.).

Bei den Versuchen, die freie Glucosidosäure durch Eindampfen der wäßrigen Lösung zu gewinnen, trat stets auf Grund der starken Acidität Zersetzung ein.

β-d-Glucosido-isäthionsaures Natrium (V).

Eine Lösung von 1 g β-d-Glucosido-isäthionsäure in 50 ccm Wasser wurde 20 Minuten lang auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit 31,3 ccm $^n/_{10}$-Natronlauge (ber. 31,6 ccm) gegen Phenolphtalein neutralisiert, die neutrale Lösung i. V. zur Trockne verdampft und der sirupöse Rückstand mit 50 ccm Methanol aufgenommen. Durch Zusatz von 400 ccm Aceton und 400 ccm absolutem Äther wurde das Natriumsalz der Glucosid-isäthionsäure als feste, weiße, amorphe, sehr hygroskopische Masse in nahezu quantitativer Ausbeute abgeschieden. Das Salz ist in Wasser und Methanol leicht löslich, in Alkohol und erst recht in anderen gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln schwer bis unlöslich. Es reduziert Fehlingsche Lösung erst nach der Hydrolyse mit Säuren. Trotz der amorphen Beschaffenheit stimmten die Analysen befriedigend auf die theoretische Zusammensetzung.

$[\alpha]_D^{20} = -0{,}44^0 \cdot 1{,}029 / 1 \cdot 0{,}015 \cdot 1{,}004 = -30{,}1^0$ (in Wasser).

Durch Animpfen mit Krystallen, die auf ganz anderem Wege gewonnen waren, konnte die Substanz auch krystallin erhalten werden (vgl. unten).

Tetracetyl-β-d-glucosido-äthylenchlorhydrin (VII).

Die Substanz wurde mit einigen Änderungen in besserer Ausbeute und größerer Reinheit als bisher[1]) gewonnen. Schmelzpunkt war 119 bis 120° (korr.), die Drehung in Chloroform ergab den folgenden Wert:

$[\alpha]_D^{19} = -0{,}67^0 \cdot 4{,}5 / 2 \cdot 0{,}074 \cdot 1{,}477 = -13{,}8^0$ (in Chloroform).

[1]) H. Coles, M. Dodds u. F. R. Bergeim, Am. Soc. 60, 1020 (1938).

β-d-Glucosido-äthylenchlorhydrin.

Die Entacetylierung wurde mit titrierter Natrium-methylat-lösung in Chloroform bei etwa -18^0 ($2^1/_4$ Stunde) durchgeführt. Nach Zusatz der genau berechneten Menge n-Schwefelsäure wurde die Chloroformschicht abgelassen, 2-mal mit Wasser gewaschen und die vereinigten wäßrigen Lösungen mit Natriumbicarbonat gegen Lackmus neutralisiert. Nach Verdampfen zur Trockne (i. V.) wurde das Glucosid aus dem Rückstand mit Methanol ausgezogen, von den Natriumsalzen abfiltriert und die klare Methanollösung eingedampft. Der Rückstand, das freie Glucosid, krystallisiert am raschesten beim Animpfen. Ausbeute 90 Proc. d. Th. Zur Reinigung wurde aus etwa 22 Volumteilen heißem Essigester umkrystallisiert. Die zunächst ölig fallende Substanz krystallisiert beim Animpfen allmählich im Laufe einiger Tage.

Die Substanz schmilzt nach kurzem Sintern bei 67 bis 68^0 (korr.). Sie schmeckt bittersüß und reduziert Fehlingsche Lösung erst nach der Hydrolyse mit Säuren.

Sie ist leicht löslich in Wasser, Methanol, Pyridin und Eisessig, löslich in Aceton, Alkohol und Dioxan, in den anderen gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln schwer bis unlöslich. Zur Analyse wurde bei 2 mm/35^0 über Phosphorpentoxyd getrocknet.

4,926 mg Subst.: 7,090 mg CO_2, 2,740 mg H_2O. — 14,509 mg Subst.: 8,455 mg AgCl.

$C_8H_{15}O_6Cl$ (242,57)	Ber.	C 39,58	H 6,23	Cl 14,62
	Gef.	„ 39,27	„ 6,23	„ 14,41.

$[\alpha]_D^{19} = -1{,}72^0 \cdot 3{,}058 / 2 \cdot 0{,}0893 \cdot 1{,}01 = -29{,}2^0$ (in Wasser).

Tetracetyl-β-d-glucosido-äthylenbromhydrin.

Die Substanz wurde wie die entsprechende Chlorverbindung aus Acetobromglucose und Äthylenbromhydrin dargestellt[1]). Sie schmilzt bei 118^0 (korr.) und zeigt die Löslichkeiten der Acetylzucker.

12,821 mg Subst.: 5,200 mg AgBr.

$C_{16}H_{23}O_{10}Br$ (455,10) Ber. Br 17,56 Gef. Br 17,26.

$[\alpha]_D^{20} = -0{,}61^0 \cdot 4{,}44 / 2 \cdot 0{,}0749 \cdot 1{,}475 = -12{,}3^0$ (in Chloroform).

β-d-Glucosido-äthylenbromhydrin.

Die Entacetylierung erfolgt wie bei dem Chlorhydrin. Die Krystallisation macht etwas größere Schwierigkeiten. Die zunächst amorphe

[1]) Vgl. Anmerkung S. 8.

Substanz wurde mit ganz wenig absolutem Alkohol gelöst und diese heiße Lösung mit 25—30 Volumteilen heißem Essigester versetzt. Durch langsames Abkühlen und Aufbewahren im Kühlschrank wurden 90 Proc. d. Th. an krystallinem Glucosid erhalten. Die Substanz schmilzt nach kurzem Sintern bei 74—75° (korr.). Sie schmeckt bitter-süß, reduziert Fehlingsche Lösung erst nach saurer Hydrolyse und ähnelt in ihrer Löslichkeit dem Chlorhydrin.

4,906 mg Subst.: 5,980 mg CO_2, 2,290 mg H_2O. — 11,610 mg Subst.: 7,425 mg AgBr.

$C_8H_{15}O_6Br$ (287,03)	Ber.	C 33,44	H 5,27	Br 27,84
	Gef.	„ 33,26	„ 5,22	„ 27,23.

$[\alpha]_D^{19} = -1{,}65^0 \cdot 3{,}057 / 2 \cdot 0{,}0957 \cdot 1{,}01 = -26{,}1^0$ (in Wasser).

Tetracetyl-β-d-glucosido-äthylenjodhydrin (VIII).

Die Substanz wurde durch Umsatz des Chlorhydrins (10 g) mit Jodnatrium (20 g = 5 Mol.) in Aceton (12 ccm) bei 100° (Einschlußrohr, etwa 15 Stunden) hergestellt. Durch Eindampfen der mit Kieselgur geklärten Acetonlösung, Aufnehmen des Rückstandes mit 50 ccm Aceton und allmählichem Zusatz von 1 Liter Wasser erhält man das Jodhydrin in einer Ausbeute von fast 90 Proc. d. Th. (10,9 g). Zur Reinigung werden 10,9 g aus 20 Teilen wäßrigem Äthanol von 33 Volumproc. umkrystallisiert. Zur Analyse wurde die Substanz in 8,5 Teilen Aceton gelöst und durch Zusatz von 85 Teilen Wasser krystallin ausgefällt. Die Substanz schmilzt bei 100 bis 101° (korr.). Sie zeigt die Löslichkeit der Acetylzucker.

10,332 mg Subst.: 4,850 mg AgJ.

$C_{16}H_{23}O_{10}J$ (502,11) Ber. J 25,28 Gef. J 25,37.

$[\alpha]_D^{20} = -0{,}81^0 \cdot 4{,}5 / 2 \cdot 0{,}1045 \cdot 1{,}471 = -11{,}9^0$ (in Chloroform).

β-d-Glucosido-äthylenjodhydrin (IX).

Die Entacetylierung wurde wie beim Chlor- und Bromhydrin in der Kälte mit titriertem Natriummethylat und der berechneten Menge Schwefelsäure durchgeführt. Die Substanz läßt sich aus einem Gemisch von absolutem Alkohol (2 Teilen) und Essigester (20 Teilen) umkrystallisieren. Sie schmeckt bitter. Fehlingsche Lösung wird erst nach saurer Hydrolyse reduziert. Die Substanz schmilzt bei 120—121° (korr.). Die Löslichkeit ist der des Chlorhydrins ähnlich.

4,681 mg Subst.: 4,905 mg CO_2, 1,900 mg H_2O. — 10,968 mg Subst.: 7,625 mg AgJ.

$C_8H_{15}O_6J$ (334,05)	Ber.	C 28,74	H 4,53	J 38,00
	Gef.	„ 28,58	„ 4,54	„ 37,59.

$[\alpha]_D^{18} = -1{,}71^0 \cdot 3{,}08 / 2 \cdot 0{,}103 \cdot 1{,}011 = -25{,}3^0$ (in Wasser).

β-d-Glucosido-isäthionsaures Natrium (V).

30 g β-d-Glucosido-äthylenjodhydrin (IX) (1 Mol.) werden mit 22,8 g krystallinem Natriumsulfit ($Na_2SO_3 \cdot 7\,H_2O$, DAB. 6, 1 Mol.) in 60—70 ccm Wasser im Einschlußgefäß 6 Stunden lang auf etwa 60° (im Chloroformdampf) erhitzt. Die gegen Lackmus neutral reagierende Lösung wurde nach Klären mit Kohle i. V. zur Trockne verdampft. Der sirupöse Rückstand wurde mit 500 ccm absolutem Methanol ausgezogen, die Lösung mit Kohle geklärt, mit 50 ccm Wasser versetzt, auf dem Wasserbad erhitzt und dann Aceton bis zur beginnenden Trübung zur heißen Lösung hinzugegeben. Beim Animpfen — die ersten Krystalle wurden aus 93 Proc. Äthanol erhalten — und langsamen Abkühlen krystallisiert das Natriumsalz in farblosen Nadeln. Die Krystallisation wird durch Zusatz von weiteren 5 Litern Aceton zur klaren Lösung und durch Aufbewahren im Kühlschrank vervollständigt. Die Ausbeute an krystallisiertem Natriumsalz war fast theoretisch. Zur Reinigung wurden 3 g der Substanz in einem Gemisch von 25 ccm Wasser und 100 ccm absolutem Alkohol heiß gelöst, die Lösung mit Kohle geklärt und zur heißen Lösung weitere 225 ccm absoluter Alkohol gegeben. Beim Animpfen und langsamen Abkühlen krystallisiert das Natriumsalz aus. Die Krystallisation wird durch Zusatz von etwa 220 ccm absolutem Äthanol zur kalten Lösung vervollständigt. Die Verbindung schmeckt erst schwach süß, dann salzig. Fehlingsche Lösung wird erst nach der Hydrolyse mit Säuren reduziert.

Für die quantitative Bestimmung wurde das Salz über Phosphorpentoxyd bei 2 mm zunächst bei 100° (Wasserdampf), dann bei 110° (Toluol) konstant getrocknet. Der Trockenverlust (0,1585 g) der lufttrockenen Substanz (2,7819 g) entspricht einem Mol Krystallwasser.

$C_8H_{15}O_9SNa \cdot H_2O$ (328,2) Ber. 5,49 Gef. 5,70.

Die wasserfreie Substanz schmilzt nach kurzem Sintern bei 130 bis 131° (korr.).

5,159 mg Subst.: 5,815 mg CO_2, 2,270 mg H_2O. — 16,743 mg Subst.: 12,515 mg $BaSO_4$. — 23,798 mg Subst.: 5,360 mg Na_2SO_4.

$C_8H_{15}O_9SNa$ (310,17)	Ber.	C 30,95	H 4,87	S 10,34	Na 7,41
	Gef.	„ 30,75	„ 4,92	„ 10,27	„ 7,31.

$[\alpha]_D^{18} = -1{,}89^\circ \cdot 3{,}09 / 2 \cdot 0{,}0879 \cdot 1{,}01 = -32{,}9^\circ$ (in Wasser).

Mit der so gewonnenen Substanz läßt sich das aus der Isäthionsäure erhaltene Natriumsalz (vgl. oben) animpfen. Beide Substanzen erwiesen sich als identisch.

Tetracetyl-β-d-glucosido-isäthionsaures Natrium.

7 g glucosido-isäthionsaures Natrium, lufttrocken, mit 1 g Krystallwasser, wurden in 105 ccm Eisessig heiß gelöst und diese Lösung nach dem Abkühlen auf 0° mit einem Gemisch von 70 ccm Essigsäureanhydrid und 125 ccm absolutem Pyridin versetzt und 20 Stunden aufbewahrt. Nach weiteren 2 Stunden bei Zimmertemperatur wurden 100 ccm Wasser von 0° zugegeben, dann die Mischung i. V. zur Trockne verdampft und der zurückbleibende Sirup noch 2-mal mit je 100 ccm Wasser aufgenommen und eingedampft. Das so hergestellte acetylierte Natriumsalz krystallisierte nicht, war aber zur weiteren Verarbeitung genügend rein.

Tetracetyl-β-d-glucosido-isäthionsäure-äthylester (III).

10,2 g des Tetracetyl-β-d-glucosido-isäthionsauren Natriums (1 Äquivalent) werden in einem Gemisch von 350 ccm Aceton und 50 ccm Methanol gelöst, diese Lösung mit einer kalt hergestellten Lösung von 1,14 ccm konzentrierter Schwefelsäure (d = 1,84) (2 Äquivalente) in 50 ccm Aceton versetzt. Es scheidet sich allmählich ein Gemisch von Natriumsulfat und Natriumbisulfat ab. In die kongosaure Lösung wurde unter Eiskühlung Diazoäthan bis zur bleibenden Gelbfärbung eingeleitet, die Mischung etwa 15 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt, dann von dem weißen, amorphen Niederschlag der Natriumsalze abfiltriert und i. V. zur Trockne verdampft. Der gelbe, neutral reagierende Rückstand wird mit 60 ccm Aceton aufgenommen und diese Lösung langsam und unter Impfen mit $1^1/_2$ Liter Wasser versetzt. Es krystallisieren 8,6 g, das ist über 83 Proc. d. Th., an dem Acetyl-glucosido-äthylester aus. Nach der Reinigung erweist sich diese Substanz nach Zusammensetzung und Eigenschaften als identisch mit der aus Isäthionsäure gewonnenen Verbindung (vgl. oben).

β-d-Glucosido-isäthionsäure-äthylester (IV).

Die Entacetylierung der Tetracetylverbindung des Esters wurde nach Zemplèn[1]) in Eiskochsalzmischung durchgeführt.

[1]) B. **59**, 1258 (1926).

Eine Mischung von 12 g Tetracetylverbindung in 60 ccm absolutem Chloroform mit 30 ccm einer 1-proc. Natriummethylatlösung in Methanol wurde 135 Minuten bei -18 bis -20^0 aufbewahrt, dann mit 300 ccm Eiswasser verdünnt und mit der berechneten Menge normaler Schwefelsäure (13,4 ccm), die titrimetrisch auf das Natriummethylat eingestellt war (Methylorange), versetzt. Nach Abheben der Chloroformschicht (die noch 2-mal mit Wasser ausgeschüttelt wird und dann nur noch einen geringen Verdunstungsrückstand hinterläßt) wurde das p_H der wäßrigen Lösung von 4,2—4,5 durch vorsichtigen Zusatz von festem Natriumbicarbonat auf 5,2—5,5 erhöht (Indicatorpapier). Der nach Verdampfen des Wassers i. V. (Bad höchstens 35^0) verbleibende sirupöse Rückstand wurde mit 500 ccm Aceton aufgenommen, diese Lösung unter Zusatz von etwas festem Natriumbicarbonat 2 Stunden bei niedriger Temperatur aufbewahrt, von den Natriumsalzen abfiltriert und erneut i. V. zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde in 4 ccm absolutem Aceton aufgenommen und langsam mit 20 ccm Essigester versetzt. Es krystallisieren 6,1 g des Glucosidoesters. Aus der Mutterlauge lassen sich durch Eindampfen zur Trockne, Impfen des Rückstandes und Verreiben mit wenig Essigester weitere 0,7 g gewinnen. Gesamtausbeute 6,8 g, das ist 87 Proc. d. Th.

Die Substanz ist nach Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, Zusammensetzung, Drehung und sämtlichen Eigenschaften identisch mit dem auf anderem Wege gewonnenen (vgl. oben) β-d-Glucosido-isäthionsäure-äthylester. Insbesondere reduziert sie Fehlingsche Lösung in der Hitze, ohne daß vorher eine saure Hydrolyse durchgeführt ist.

Endgültige Reinigung erfolgt entweder nach den oben angegebenen Krystallisationsmethoden oder durch Lösen in etwa 18 Volumteilen absolutem Aceton, Klären dieser Lösung mit Kohle und portionsweiser, langsamer Zugabe (unter Impfen) von im ganzen 90 Volumteilen absolutem Äther.

Alkalispaltung des β-d-Glucosido-isäthionsäure-äthylesters.

In dem Molekül der Substanz sind zwei alkali-empfindliche Stellen, einmal (wie zu erwarten) die Ester-bindung, weiter

aber auch (unerwarteterweise) die Glucosid-bindung. Diese letztere ist nur so lange alkali-empfindlich, als die Esterbindung intakt ist. Schließlich wird unter dem Einfluß des Alkalis der abgespaltene, Isäthionsäure-ester ebenfalls in Alkohol und Säure verseift. Außerdem muß man mit einer Veränderung der abgespaltenen Glucose unter dem Einfluß des Alkalis rechnen, die sich in der Drehung durch ein Absinken der positiven Werte ausdrückt.

Die Alkali-spaltung wurde mit $^n/_{100}$-Natronlauge und mit $^n/_{20}$-Natronlauge durchgeführt.

1. Spaltung mit $^n/_{100}$-NaOH.

0,6422 g Glucosido-ester wurden in 39,0 ccm $^n/_{100}$-Natronlauge gelöst und bei etwa 20° aufbewahrt. Anfangsdrehung: $-0{,}70°$ (2-dm-Rohr), Drehung nach 5 Stunden: $\pm 0{,}00°$, konstant für weitere 4 Stunden. Das Anfangs-p_H von 11,2 sank in den ersten 5 Stunden langsam auf 10,0, dann schneller. Die durch Wasser und durch Alkali bewirkte Esterverseifung ergab eine immer stärkere Acidität. Dadurch wird das Alkali abgestumpft und damit die Glucose-abspaltung verlangsamt. Diese Glucose-abspaltung wird aber auch unterbunden, soweit die Ester-bindung des Glucosido-esters vor Abspaltung der Glucose gelöst wird. Damit erklärt sich, daß bei Verwendung dieser Alkali-menge und Konzentration die Abspaltung der Glucose bei 47 Proc. — errechnet aus der Drehung — stehen bleibt. Eine Berücksichtigung der Drehungs-änderung der abgespaltenen Glucose durch das Alkali unterblieb, da in einem Parallelversuch festgestellt wurde, daß diese Änderung in der Zeit von 5 Stunden bei $^n/_{100}$-Natronlauge vernachlässigt werden kann.

Die abgespaltene Glucose wurde in ihr Osazon übergeführt: Schmelzp. 195—198°; der Mischschmelzpunkt mit reinem d-Glucosazon (209—210°) war 205°.

2. Spaltung mit $^n/_{20}$-NaOH.

0,6424 g β-d-Glucosido-isäthionsäure-äthylester wurden in 39,0 ccm $^n/_{20}$-NaOH aufgelöst und bei 19° aufbewahrt. Als Kontroll-lösung wurden 1,1256 g Glucose in 120 ccm $^n/_{20}$-NaOH aufgelöst und ebenfalls bei 19° aufbewahrt. Die Drehung wurde im 2-dm-Rohr verfolgt (Tab. 1).

Nach 7 Stunden (Maximum der Drehung = 100 Proc. Glucoseabspaltung) wurden 30,0 ccm der Glucosido-ester-lösung erst mit $^n/_{10}$-Salzsäure titriert (Phenolphtalein) und dann daraus möglichst quantitativ das Osazon gefällt. Zum Vergleich wurden je 30 bzw. 15 ccm der Glucose-lösung nach $1^1/_2$ und nach 7 Stunden ebenso behandelt (Tab. 2).

Tabelle 1.

Nr. der Messung	Stunden	α_t Glucosidoester in °	α_t Glucose in °	% Glucoseabspaltung
1	0,25	− 0,27	+ 0,86	32,3
2	0,5	− 0,03	+ 0,84	47,2
3	0,75	+ 0,14	+ 0,83	57,8
4	1,0	+ 0,26	+ 0,83	65,2
5	1,5	+ 0,43	+ 0,81	75,8
6	3,0	+ 0,68	+ 0,76	91,3
7	3,5	+ 0,74	+ 0,74	95,0
8	4,5	+ 0,79	+ 0,72	98,2
9	5,5	+ 0,81	+ 0,67	99,4
10	7,0	+ 0,82	+ 0,63	100
11	10,0	+ 0,79	+ 0,57	
12	21,5	+ 0,64	+ 0,33	

Als Enddrehung (= 100 Proc. Glucose-abspaltung) wurde das Maximum der Drehung (Versuch 10) nach 7 Stunden zugrunde gelegt.

Anfangsdrehung für den Glucosidoester — 0,79°, für die Glucose + 0,98°. Bei Berechnung der Spaltprocente blieb die Änderung der Drehung der abgespaltenen Glucose unberücksichtigt, da sie auch durch die Kontrollbestimmung mit Glucose allein nur geschätzt werden kann. Der Fehler kann nicht sehr groß sein. Die Zeit bis zu 100 Proc. Spaltung kann wegen dieses Fehlers nur kürzer, nicht länger sein.

Tabelle 2.

Versuch	ccm $^n/_{10}$-HCl	Äquiv. NaOH verbraucht	Osazon			$[\alpha]_D^{19}$ nach 2 Stdn. in abs. Pyridin(°)
			g	Schmp. in °	% d. Th.	
1. Glucosido-ester 30,0 ccm nach 7 Stdn. (Nr. 10 der Tab. 1) . .	11,15	0,25	0,1765	gegen 187	31,6	−90,7
2. Glucose, nach 7 Stdn. 15,0 ccm (Nr. 10 d. Tab. 1)	7,10	0,047	0,1639	205 (Zers.)	58,8	
3. Glucose, nach 1,5 Std. 30,0 ccm (N. 5 der Tab. 1)	14,65	0,017	0,3110	205 (Zers.)	55,7	−94,0

Die Osazone aus der Glucose-lösung einerseits, aus der Glucosido-ester-lösung andererseits sind etwas verschieden. Abgesehen von Ausbeuten, den Schmelzpunkten und den Drehungen ist auch das Aussehen zunächst nicht ganz gleich. Das Osazon aus dem Ester ist dunkler. An diesen Verschiedenheiten ändert sich auch nichts, wenn der Glucose-lösung vor der Osazondarstellung etwas Alkohol und Isäthionsäure beigemengt wird. Wir halten aber die Verbindung aus dem Glucosido-ester doch für Glucosazon, da die Mischschmelzpunkte stets zwischen den Einzel-schmelzpunkten liegen und da Aussehen und Schmelzpunkt nach dem Umkrystallisieren aus Pyridin durch Fällen mit Wasser gleich werden.

Ferment-spaltungen.

Die Bestimmungen der Wertigkeiten für Süßmandelemulsin war die übliche[1]). Die Anfangsdrehung wurde im gesonderten Versuch ohne Ferment bestimmt, die Enddrehung aus dem Substratgehalt errechnet. Die Konzentration der Fermentlösung ergab (g Ferment in 50 ccm Bestimmungsgemisch) 0,1140 g. Die Drehungen gelten für 1 dm-Rohr.

Tabelle 3.

β-d-Glucosid von	Anfangs-Drehung	t'	Drehung nach t'	% Spaltung	Wertigkeit
Isäthionsaures Natrium	− 0,53	4200	− 0,27	25,5	0,0009
	− 0,53	5040	− 0,22	30,4	0,0009
Isäthionsäure-äthylester	− 0,40	10	− 0,20	22,5	0,32
	− 0,40	13	− 0,15	28,1	0,32
Äthylenchlorhydrin . .	− 0,37	8	− 0,16	24,4	0,44
	− 0,37	9	− 0,14	26,7	0,44
Äthylenbromhydrin . .	− 0,39	6	− 0,18	23,9	0,58
	− 0,39	8	− 0,12	30,7	0,58
Äthylenjodhydrin . . .	− 0,44	4	− 0,20	25,8	0,94
	− 0,44	5	− 0,15	31,2	0,95

[1]) A. **537**, 11 (1938).

Über anormale osmotische Effekte an Kettenmolekülen. II.

Synthese und kryoskopisches Verhalten von Poly-depsiden[1]);

von *Friedrich Klages*, *Fritz Kircher*[2]) und *Julius Fessler*[3]).

Mit 4 Figuren im Text.

[Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayer. Akademie der Wissenschaften zu München.]

(Eingelaufen am 2. August 1939.)

In der 1. Mitteilung konnte folgendes gezeigt werden:

Die *Hendeka-methyl-cellotriose* erweist sich auf Grund des partiellen Abbaus sowie nichtosmotischer Mol.-Gew.-Bestimmungen (Dialysengeschwindigkeit) eindeutig als Trisaccharid, und aus analogen Gründen ist auch an der Trisaccharid-natur der *Hendeka-methyl-raffinose* kein Zweifel möglich. Trotzdem verhalten sich beide Zucker [ersterer in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Hess u. Ulmann[4])] in wäßriger Lösung in gewissen Konzentrationsbereichen osmotisch (bzw. kryoskopisch) wie ein Monosaccharid. Da methodische Fehlerquellen weitgehend ausgeschlossen werden konnten, wurde dieser Effekt und damit auch die zahlreichen von Hess u. Mitarbeitern[5]) im Sinne kleiner Molekulargewichte gedeuteten ähnlichen Beobachtungen an hochmolekularen Cellulose-derivaten, als osmotischer Anomalie-effekt gedeutet, der sicher unabhängig von der hochmolekularen Natur und auch dem chemischen Aufbauprinzip der Cellulose ist.

Im weiteren Verlauf dieser Untersuchung erschien es vor allem wünschenswert, durch Untersuchung auch anderer Substanzgruppen die Allgemeingültigkeit dieses neuen Effektes, insbesondere seine Unabhängigkeit von der Kohlehydratnatur, nachzuweisen, und dann zu organischen Lösungsmitteln mit größerer Gefrierpunktskonstante überzugehen, da die bisher beobachteten Effekte in wäßriger Lösung infolge der

[1]) 1. Mitt.: A. 520, 71 (1935).
[2]) 1. Teil der Dissertation, München 1940.
[3]) Dissertation, München 1940.
[4]) Hess und Ulmann, A. 498, 77 (1932).
[5]) Ausführliche Literaturzusammenstellung vgl. 1. Mitt.

ungünstigen kryoskopischen Eigenschaften des Wassers sehr nahe an der Fehlergrenze lagen und dadurch eine gewisse Unsicherheit aufwiesen.

Als Modellsubstanzen für die Kohlenhydrate wählten wir die schon in der 1. Mitteilung vorgeschlagenen *Poly-depside*, die den Kohlenhydraten gegenüber den Vorteil der leichten synthetischen Zugänglichkeit besitzen und, wie kaum eine andere Verbindungsklasse, den Oligo-sacchariden im physikalischen Aufbau so ähnlich sind, daß bei Richtigkeit unserer Anschauungen ein ähnliches osmotisches Verhalten zu erwarten war. Als synthetische und krystallisierende Substanzen relativ niederen Mol.-Gew. bieten sie außerdem, wie die Oligo-saccharide, den Vorteil des völligen Ausschlusses der bei hochmolekularen Verbindungen so schwer übersehbaren Komplikationsmöglichkeiten.

Da die bisher in der Literatur beschriebenen Poly-depside mit drei und mehr Ringgliedern — von welcher Molekülgröße ab nach den Erfahrungen bei den Oligo-sacchariden erst das Auftreten des gesuchten Effektes zu erwarten war — wenig zahlreich sind, und auch aus anderen Gründen für vorliegende Untersuchung nicht geeignet erschienen, haben wir uns entschlossen, die erforderlichen Verbindungen nach den für diese Untersuchung zweckmäßigsten Gesichtspunkten selbst zu synthetisieren.

I. Polydepsid-synthesen (Fritz Kircher).

Bei der Auswahl der zu synthetisierenden Verbindungen gingen wir von folgenden Überlegungen aus:

1. Sollten die Verbindungen den Kohlenhydraten möglichst ähnlich sein und außerdem möglichst gute Löslichkeitseigenschaften aufweisen. Wir verwandten daher ausschließlich *Gallussäure-derivate*, die infolge ihrer zahlreichen Seitenketten diesen Anforderungen am ehesten entsprechen.

2. Zur Erreichung der Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln wurden in allen Fällen sämtliche freien OH-Gruppen durch Acetyl- oder Methoxyl-Reste substituiert. Auf diese Weise konnte gleichzeitig verhindert werden, daß beobachtete osmotische Effekte durch elektrolytische Dissoziation der

schwach sauren phenolischen OH-Gruppen vorgetäuscht werden.

3. Sollten an diesen Verbindungen Unregelmäßigkeiten der wichtigsten, zu Mol.-Gew.-Bestimmungen herangezogenen physikalischen Beziehungen, eben der osmotischen Gesetze, nachgewiesen werden. Da man bisher eher geneigt war, umgekehrt auf Grund osmotischer Befunde seine chemischen Vorstellungen zu revidieren (z. B. elektrolytische und Radikaldissoziation, Theorie kleiner Cellulose-moleküle), war es ein Haupterfordernis, auf rein chemischem Wege, oder zumindest durch nichtosmotische physikalische Methoden, eine möglichst sichere Festlegung der Molekülgröße durchführen zu können. Wir haben auf diesen Punkt besonderen Wert gelegt und glauben, auf Grund der folgenden 4 Argumente für jede der synthetisierten Substanzen eindeutige Aussagen hinsichtlich der Molekülgröße machen zu können:

a) Die übersichtlich und mit guter Ausbeute verlaufende Synthese.

b) Zur analytischen Nachprüfung der Synthese wurden Acetyl- und Methoxylbestimmungen ausgeführt. Diese hatten besonders dadurch beweisenden Wert, daß wir nicht nur eine Substitutionsart gewählt haben, bei der sich die Werte mit wachsender Kettenlänge asympthotisch einem Endwert nähern, sondern nach Möglichkeit Acetyl- und Methoxyl-gruppen nebeneinander in das Molekül eingeführt haben, damit sich aus dem gegenseitigen Verhältnis beider Gruppen, analog dem Endgruppenprinzip von Staudinger, eindeutig die Molekülgröße ergibt.

c) Die dann noch verbleibende Möglichkeit, daß die richtigen Analysenergebnisse durch das Vorliegen eines Gemisches der zur Synthese verwandten niederen Säuren vorgetäuscht werden, konnte durch Äquivalentgewichtsbestimmungen in Alkohol–Chloroform-lösungen mit Natriumalkoholat einwandfrei widerlegt werden.

d) Schließlich sprechen für die Einheitlichkeit der dargestellten Verbindungen auch noch die Schmelzpunkte, die in jeder Reihe mit wachsender Molekülgröße ansteigen, also nicht durch Mischungen niedermolekularer Substanzen zustande

kommen können. Auch zeigen die Mischschmelzpunkte benachbarter Glieder in den verschiedenen Reihen stets ziemlich starke Depressionen, was ebenfalls für das Vorliegen selbständiger Verbindungen spricht. Durch diese Schmelzpunktsdepressionen wird gleichzeitig Mischkrystallbildung ausgeschlossen, so daß, im Gegensatz zu den eigentlichen Hochpolymeren, die Höhe des Schmelzpunktes tatsächlich als Kriterium für die Einheitlichkeit der Substanzen herangezogen werden kann, und nicht etwa nur ein Zeichen für die Beimengung hochmolekularer Verunreinigungen ist.

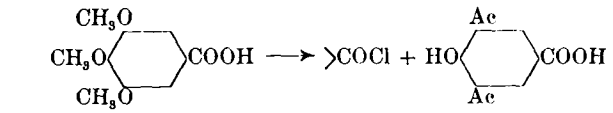
Die Synthese selbst wurde nach der bekannten Methode von Emil Fischer[1]) durch Kondensation eines Säurechlorids mit einer phenolischen Komponente in acetonischer Lösung durch wäßrige Natronlauge durchgeführt. Eigenartigerweise hat diese relativ primitive Methode zu viel besseren Resultaten geführt, als die sonst viel milder wirkende und weniger zu Nebenreaktionen neigende Pyridin-methode nach Einhorn, die in keinem Fall krystallisierte Produkte ergab. Dank der ausgezeichneten Krystallisationsfähigkeit selbst der höher molekularen Verbindungen (bis M = 970) und dem Vermeiden von Mischkrystallbildung waren alle Substanzen bereits nach 2—4-maligem Umkrystallisieren analysenrein und konnten in diesem Zustand in 35—60-proc. Ausbeute erhalten werden.

Um eine größere Auswahl mehrgliedriger Verbindungen zur Verfügung zu haben und zufällige Fehlerquellen möglichst auszuschließen, wurden drei voneinander unabhängige Reihen von Verbindungen synthetisiert:

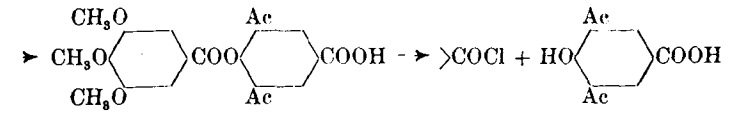
1. Reihe: Säuren. Durch Verknüpfen des Chlorids der *Trimethyl-gallussäure* (I, M = 212) mit 3,5-Diacetyl-gallussäure, Chlorieren der entstandenen *α-Trimethyl-β-diacetyl-digallussäure* (II, M = 448) und erneuter Kondensation mit Diacetyl-gallussäure zur *α-Tri-methyl-β,γ-tetracetyl-trigallussäure* (III, M = 684) und nochmaliger Wiederholung dieser Operationen bis zur Stufe der *α-Trimethyl-β,γ,δ-hexacetyl-tetragallussäure* (IV, M = 920) wurde die folgende polymer-homologe Reihe gewonnen, in der in völlig eindeutiger Weise sowohl der

[1]) E. Fischer, M. Bergmann und E. Lipschitz, B. 51, 45 (1918).

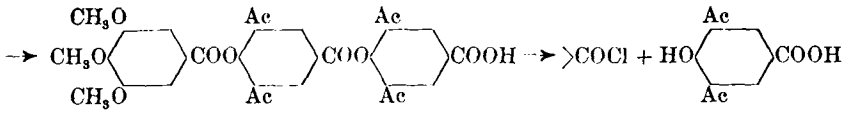
Trimethyl-galloylrest, als auch die freie Carboxylgruppe die für die Mol.-Gew.-Bestimmung wichtige Funktion der Endgruppe übernehmen:



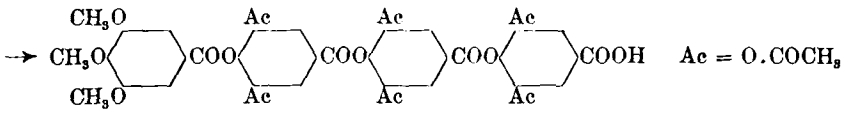
I



II



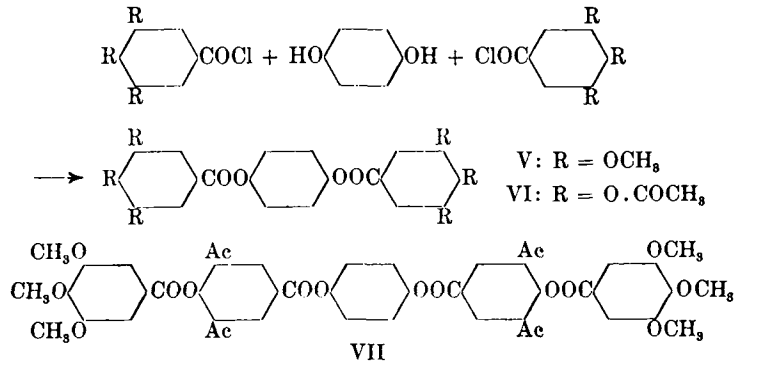
III



IV

Bei der Leichtigkeit, mit der auch noch das letzte Glied der Reihe entstand und gereinigt werden konnte, war mit dieser Molekülgröße die Grenze der synthetischen Möglichkeiten noch längst nicht erreicht. Doch war bereits hier die Löslichkeit in den für kryoskopische Messungen in Frage kommenden Lösungsmitteln so gering, daß noch höhere Glieder für unsere Untersuchungen nicht mehr in Betracht gekommen wären. Auch ist bei dem hier eingeschlagenen stufenweisen Aufbau der Verbindungen der Substanzverbrauch für die Synthese noch höherer Glieder unverhältnismäßig groß. Es wurde daher in einer

2. Reihe von Neutralkörpern ein anderes Bauprinzip angewandt, nach dem die Depsidreste mit einem 2-wertigen Phenol, dem *Hydrochinon*, kondensiert werden, um schneller zu größeren Molekülen zu kommen:



VII

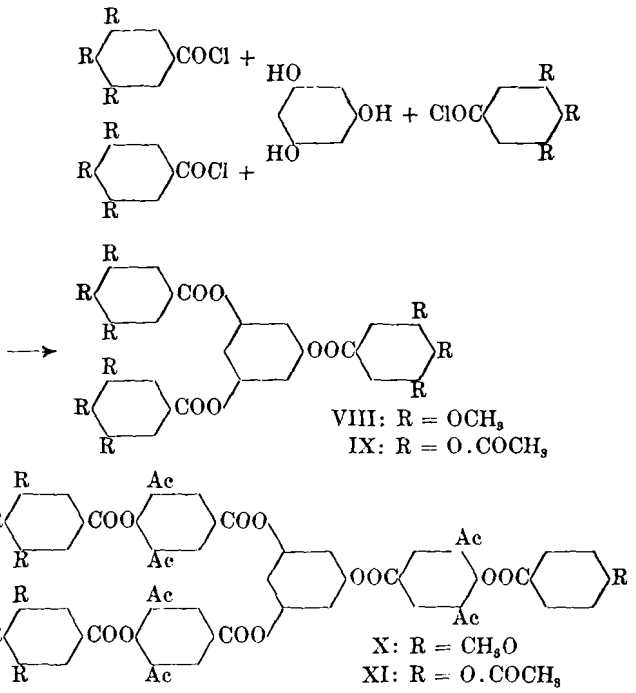
An Verbindungen wurden in aus der Formel leicht ersichtlicher Weise dargestellt: Das *Di-(trimethyl-galloyl)-hydrochinon* (V, M = 498), das *Di-(triacetyl-galloyl)-hydrochinon* (VI, M = 666) und als höchstmolekulare Verbindung überhaupt, die noch zur Krystallisation gebracht werden konnte, aus dem Chlorid von II mit Hydrochinon das *Di-(α-trimethyl-β-diacetyl-digalloyl)-hydrochinon* (VII, M = 970) mit 5 Ringgliedern in geradliniger Anordnung.

Der Vorteil dieser Methode bestand darin, daß das Molekül mit jedem Schritt um doppelt soviel verlängert wird, wie oben. Dies bietet, außer der erwähnten Substanzersparnis, den Vorteil, daß der Mol.-Gew.- und damit auch Löslichkeits-Unterschied zwischen Ausgangs-substanz und Endprodukt, namentlich bei den ohnehin schwerer zu reinigenden höheren Gliedern der Reihe, erheblich größer ist, als in der ersten Reihe, und daher das Endprodukt leichter rein erhalten werden kann. Die oben als Kriterium für die Molekülgröße angeführte Alkoholattitration zeigt in diesem Falle direkt den Grad der Verunreinigung durch die zur Synthese verwandten niedermolekularen Gallussäuren an.

Auch diese Reihe wurde lediglich aus Löslichkeitsgründen abgebrochen, obgleich die Synthese eines Siebenringkörpers mit Hilfe des für die Synthese von IV bereits dargestellten Chlorids von III durchaus im Bereich der Möglichkeit gelegen hätte. Im ganzen zeigte diese Gruppe gegenüber der ersten sehr schlechte Löslichkeits-Eigenschaften und konnte auch in

verdünntester Lösung nur in übersättigtem Zustand kryoskopisch bestimmt werden.

3. Reihe: Neutralkörper mit verzweigter Kette. Schließlich wurde in einer 3. Reihe das Bauprinzip der Oligosaccharide erstmalig verlassen. Es wurden, ähnlich wie bei der 2. Gruppe, durch Verwendung des 3-wertigen *Phloroglucins* als phenolische Komponente Neutralkörper mit verzweigter Kette hergestellt, um den Einfluß der Verzweigung auf den erwarteten Anomalie-effekt zu untersuchen:



Im ganzen wurden 4 Verbindungen erhalten: Das *Tri-(trimethyl-galloyl)-phloroglucin* (VIII, M = 708), das *Tri-(triacetyl-galloyl)-phloroglucin* (IX, M = 960), sowie aus den entsprechenden Digallussäure-chloriden das *Tri-(α-trimethyl-β-diacetyl-digalloyl)-phloroglucin* (X, M = 1416) und das *Tri-(pentacetyl-digalloyl)-phloroglucin* (XI, M = 1668). Die Zunahme der Molekülgröße erfolgt hier noch rascher, als in der

2. Reihe, so daß auch die Verbindungen X und XI mit Mol.-Gew. um 1500 ohne Schwierigkeit in größerer Menge zugänglich sind. Ebenso ist infolge der unregelmäßigeren Molekülgestalt die Löslichkeit größer, als in den beiden ersten Reihen, wodurch die Reinigung und auch die osmotischen Bestimmungen wesentlich erleichtert wurden.

Die Reihe mußte aber aus einem andern Grunde abgebrochen werden. Infolge der unregelmäßigeren Molekülgestalt nimmt nicht nur die Löslichkeit zu, sondern, wie nicht anders zu erwarten war, auch die Krystallisationsfähigkeit ab, und infolgedessen konnten die Verbindungen X und XI in keinem Lösungsmittel mehr zur Krystallisation gebracht werden. Immerhin gelang es, sie durch mehrfaches langsames Umfällen aus Aceton mit Äther bis zu einem konstanten Erweichungspunkt zu reinigen, und sie zeigten in diesem Zustand die richtigen Analysen, sowie durch Alkoholat-titration die weitgehende Abwesenheit der zur Synthese verwandten Säuren, so daß sie trotz ihres amorphen Zustandes durchaus als einheitliche und in ihrer Konstitution und Molekülgröße sichergestellte Verbindungen anzusehen sind.

Für sämtliche der hier beschriebenen 10 Substanzen konnte auf Grund der oben gegebenen Kriterien die Molekül-größe und Struktur eindeutig bestimmt werden, so daß sie für unsere Untersuchungen brauchbar erschienen. Leider sind dagegen die für osmotische Messungen wichtigen Löslichkeitseigenschaften weniger erfreulich: Sie sind in der Kälte leicht löslich nur in Chloroform (und schmelzendem Naphtalin), sowie die niederen Glieder in Pyridin, Dioxan und Aceton, heiß löslich und umkrystallisierbar aus Eisessig, Bromoform und Alkohol; doch wurde letzterer wegen der Gefahr von Umesterungen nicht zur Reinigung verwandt. Sie sind dagegen unlöslich in Äther, Campher, Benzol und andern tief schmelzenden Kohlenwasserstoffen. Für kryoskopische Messungen kamen infolgedessen von den gebräuchlichen Lösungsmitteln nur *Eisessig*, *Dioxan* und *Bromoform* in Betracht, während Benzol und Campher, die in mancher Hinsicht von Interesse gewesen wären, leider völlig ausfielen. Aber auch so konnten wegen der

Schwerlöslichkeit die meisten Messungen nur in übersättigter Lösung ausgeführt werden und mußten zum Teil wegen zu schneller Krystallisation überhaupt ausfallen.

II. Kryoskopische Messungen (Julius Fessler).

A. Apparatur.

Die Messungen wurden in der in Fig. 1 wiedergegebenen Beckmann-Apparatur ausgeführt, die, namentlich im Hinblick auf die Verwendung hygroskopischer Lösungsmittel, gegenüber der üblichen etwas modifiziert wurde:

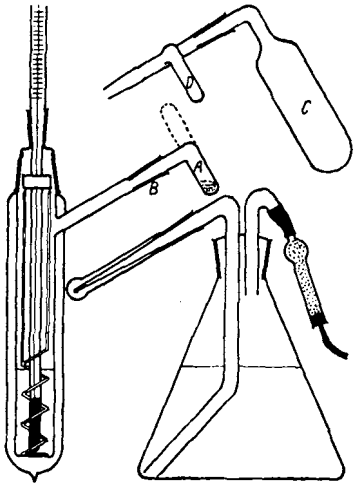


Fig. 1.

1. Um die oft schwierige genaue Einstellung des Thermostaten auf die Konvektionstemperatur[1]) zu umgehen, wurde das eigentliche Gefriergefäß mit einem Hochvakuum-mantel umgeben, durch den der Wärmefluß zwischen Bad und Gefäß so gering wird, daß Schwankungen des Bades um $\pm$ 0,3° den Gefrierpunkt um weniger als 0,001° beeinflussen. Die Badtemperatur wurde daraufhin auf $\pm$ 0,1° auf den Gefrierpunkt des jeweiligen Lösungsmittels einreguliert und bei sämtlichen Messungen, unabhängig von der erwarteten Gefrierpunktsdepression, so belassen.

2. Die Einfüllung des Lösungsmittels in das zur volumetrischen Bestimmung der Gewichtsmenge graduierte Gefriergefäß aus der Vorratsflasche geschah in leicht ersichtlicher Weise mit Hilfe des eingeschliffenen

[1]) Hess und Garthe, B. **64**, 882 (1931).

Spritzaufsatzes ohne Benetzung des Einfüllstutzens und des Schliffes *B*, so daß die Luftfeuchtigkeit so gut wie vollständig ausgeschlossen wurde und nach Einsetzen des Substanzgefäßes *A* (oder *C*) völliger Luftabschluß erreicht war. Zur Herstellung der Lösung selbst wurde dann Lösungsmittel aus dem Gefriergefäß zurückgekippt und die Substanz entweder durch Erhitzen in *A* direkt gelöst oder bei schwerlöslichen Substanzen in das Gefriergefäß gespült und dort unter dauerndem Rühren im Glycerinbad bis zur Lösung erwärmt.

Die hierbei notwendige Benetzung des Schliffes *B* beeinflußt, wie Blindversuche zeigten, innerhalb 24 Stunden den Schmelzpunkt nicht, da die Luftfeuchtigkeit durch die capillare Lösungsmittelschicht nur sehr langsam in das Innere diffundiert. Dagegen mußten die zur Ermöglichung eines Druckausgleiches trockenbleibenden Thermometerschliffe sorgfältig vor Wasserspritzern geschützt werden.

3. Die Gefäße *C* und *D* dienten zur Abtrennung eines Teiles des Lösungsmittels vor der Herstellung der Lösung für die Untersuchung der unten beschriebenen Konzentrationsreihen.

4. Die Messungen selbst geschahen in der üblichen Weise, indem sowohl der Blindwert als auch die Lösung mindestens je 2-mal unterkühlt und gemessen wurden. Um die für eine exakte Temperatureinstellung erforderliche möglichst große Menge fester Phase zu erhalten, haben wir um den verhältnismäßig großen Betrag von 1—2° unterkühlt, da bei den für diese Untersuchungen in Betracht kommenden geringen Konzentrationen die beim Ausfrieren auch relativ großer Lösungsmittelmengen (1—2 Proc.) stattfindenden Konzentrations- und damit auch Gefrierpunkts-Änderungen noch innerhalb der Fehlergrenze liegen.

Die auf diese Weise erzielte Fehlergrenze betrug anfangs etwa $\pm 0{,}002^0$, später, beim Arbeiten im temperatur-konstanten Raum ($\pm 1^0$) mit etwa 80-proc. Sicherheit $\pm 0{,}001^0$.

B. Messungen in Dioxan.

Das für die Messungen verwandte Dioxan wurde in Anlehnung an die Vorschriften von Eigenberger[1]) und Oxford[2]) auf folgendem Wege gereinigt:

Normales technisches Dioxan wird zunächst zur Zerstörung des beigemengten Äthyliden-acetals mit etwa 10 Proc. $^n/_1$-Salzsäure versetzt und unter Durchleiten eines Stickstoffstromes 2 Tage am Rückfluß gekocht. Nach Neutralisation der Säure und Vortrocknen mit festem Natriumhydroxyd wurde durch weiteres 24-stündiges Kochen am Rückfluß über metallischem Natrium scharf getrocknet und durch einen 4-Kugelaufsatz

[1]) J. pr. **130**, 78 (1931).
[2]) Bio. J. 28, 1325 (1934).

fraktioniert destilliert. Die nach Erreichen des konstanten Siedepunktes (101°/715 mm) übergehende Fraktion (etwa $^3/_4$ der Gesamtmenge) war schon weitgehend rein und zeigte nach 2-maligem Ausfrieren einen Schmelzpunkt von 11,75°[1]), also nahezu den gleichen Wert (11,80°), den später Hess[2]) mit Hilfe einer ähnlichen Methode erreicht hat. Das Dioxan wurde in verschiedenen Reinheitsstufen, bis herunter zum Schmelzp. 11,5°, für die Messungen verwandt.

Die mit diesem Dioxan erhaltenen Gefrierpunktsdepressionen sind in Tab. 1 wiedergegeben. In etwa der Hälfte der Fälle wurden die Werte zur Kontrolle der erreichten Fehlergrenze durch 2—3-malige Wiederholung der Bestimmung bestätigt. Die angegebenen Fehlergrenzen entsprechen einem Temperatur-Spielraum von $\pm$ 0,001—0,0015°, sie umfassen also nur die methodischen Ablesefehler, nicht aber die, namentlich in konzentrierteren Lösungen auftretenden systematischen Fehler, wie Assoziations- oder Solvatationseffekte.

Als erstes Ergebnis kann zunächst einmal festgestellt werden, daß bei den Substanzen I, II, VIII, IX, XI und wahrscheinlich auch XII die aus den Depressionen berechneten Mol.-Gew. stets innerhalb der angenommenen Fehlergrenze mit den tatsächlichen, oder zumindest untereinander, übereinstimmen. Damit ist nicht nur die Brauchbarkeit der beschriebenen Apparatur erwiesen, sondern es wird auch für die schon recht komplizierten Substanzen VIII, IX und XI der einwandfreie Verlauf der Synthese nachträglich noch durch Gefrierpunktsmessungen bestätigt.

Um so wichtiger ist daher das Verhalten der übrigen Verbindungen, die sämtlich viel zu hohe Depressionen aufweisen und dementsprechend zu kleine Mol.-Gew. liefern. Der erwartete Effekt tritt hier in vollem Umfang ein, wie im einzelnen aus folgenden Punkten hervorgeht:

1. Der Absolutwert der Abweichung vom theoretischen Wert erreicht, mit Ausnahme der schwerlöslichen Verbindungen V und VII, sowie von XI, bei allen Substanzen Werte bis zu

---

[1]) Mit Hilfe eines Beckmann-Thermometers gemessen, das zwischen dem bei 13,154° liegenden Natriumsulfat-Natriumnitrat-Fixpunkt und dem bei 17,878° liegendem Natriumsulfat-Natriumchlorid-Fixpunkt [Löffler, Z. El. Ch. **36**, 716 (1930)] geeicht wurde.

[2]) Hess und Frahm, B. **71**, 2627 (1938).

Tabelle 1.

Substanz		Konzentrationen in Gew.-%[1]					
		1,0	0,5	0,25	0,10	0,05	0,025
I	$\Delta t.10^3$		102	52—53			
M = 212	M gef.	—	232 ± 2%	236 ± 3%	—	—	—
	M/x ber.		M/1 = 212	M/1 = 212			
II	Desgl.	115—116		29	11		
M = 448		412 ± 2%	—	410 ± 5%	432 ± 15%	—	—
		M/1 = 448		M/1 = 448	M/1 = 448		
III	Desgl.	154	80	38	17	11	
M = 684		308 ± 1%	297 ± 2%	313 ± 5%	280 ± 10%	216 ± 10%	—
		M/2 = 342	M/2 = 342	M/2 = 342	—	M/3 = 228	
IV	Desgl.		50	25—27	13	11	
M = 920		—	475 ± 3%	456 ± 6%	366 ± 10%	216 ± 10%	—
			M/2 = 460	M/2 = 460	—	M/4 = 230	
V	Desgl.				15[2]	9—10	7
M = 498		—	—	—	306 ± 10%	250 ± 15%	170 ± 15%
					—	M/2 = 249	M/3 = 166
VI	Desgl.		75	36—37	18	13	
M = 666		—	313 ± 2%	325 ± 6%	260 ± 8%	185 ± 12%	—
			M/2 = 333	M/2 = 333	—	M/3 = 222	
VII	Desgl.			24	12—13	12	6—7
M = 970		—	—	495 ± 6%	380 ± 10%	198 ± 10%	185 ± 15%
				M/2 = 485	—	M/5 = 194	M/5 = 194
VIII	Desgl.	67	27		6—7		
M = 708		708 ± 2%	880 ± 5%	—	732 ± 15%	—	—
		M/1 = 708	M/1 = 708		M/1 = 708		
IX	Desgl.	107[3]	26		5		
M = 960		890 ± 1%	913 ± 5%	—	950 ± 20%	—	—
		M/1 = 960	M/1 = 960		M/1 = 960		
X	Desgl.		22		6	4	
M = 1416		—	1080 ± 7%	—	790 ± 20%	600 ± 30%	—
			—		M/2 = 708	M/2 = 708	
XI	Desgl.		12	6—7		1—2	
M = 1668		—	1980 ± 12%	1830 ± 20%	—	> 1600	—
			M/1 = 1668	M/1 = 1668		M/1 = 1668	
XII[4]	Desgl.			18		4—5	3
M = 658		—	—	665 ± 7%	—	530 ± 30%	400 ± 50%
				M/1 = 658		M/1 = 658	—

[1]) Die tatsächlichen Konzentrationen schwanken um etwa ± 10 Proc. um die hier angegebenen Mittelwerte. Die beobachteten Gefrierpunktsdepressionen sind auf Grund der Beziehung $\Delta t/c$ = konst. auf diese Mittelwerte umgerechnet. — [2]) Die Lösung trübte sich während der Messung infolge beginnender Krystallisation. Doch erfolgte diese so langsam, daß die Werte im allgemeinen reproduzierbar waren.

[3]) In 2-proc. Lösung gemessen, nicht umgerechnet.

[4]) XII = Hendeka-methyl-cellotriose.

mindestens 0,025°, also Werte, die weit außerhalb der Fehlergrenze liegen und bei Kohlenhydraten niemals beobachtet wurden.

Als größte Abweichung überhaupt wurde in einer 4,93-proc. Lösung von III in Dioxan eine Depression 0,796° beobachtet (in Übereinstimmung mit der Tabelle einem Mol.-Gew. von 294 entsprechend), statt wie erwartet, 0,35°. Der Anomalie-effekt beträgt also fast 0,5°. Auch das Verhalten von Verbindung VII ist interessant: Die in 0,05-proc. Lösung beobachtete Depression ist größer als die der sich normal verhaltenden, zur Synthese von VII verwandten Säure II in der doppelten Konzentration. Mit Verunreinigungen lassen sich also diese Werte nicht mehr erklären. Bei X und besonders bei XII sind die Abweichungen von der Theorie dagegen so gering, daß hieraus keine exakten Schlüsse gezogen werden können.

2. Der Grad der Abweichung erscheint in allen Fällen verständlich, das heißt er steht in voller Analogie zu den bei den Kohlenhydraten beobachteten Verhältnissen: So verhalten sich die Verbindungen mit 1—2 Ringen normal und erst von 3-gliedrigen Molekülen ab tritt die „scheinbare Dissoziation" ein, die, wie dort, mit der Verdünnung zunimmt. Ferner wird, wie dort, als Endwert das scheinbare Mol.-Gew. eines Ringgliedes beobachtet, und es treten, vor Erreichung dieser Endstufe, über ein breiteres Konzentrationsintervall konstante Zwischenstufen auf, die ebenfalls genau einer Zwei- oder Dreiteilung des Moleküls entsprechen. Der Übergang zur letzten Stufe findet allgemein im Konzentrationsgebiet um 0,1—0,05 Proc. statt.

3. An Abweichungen gegenüber den Kohlenhydraten fällt vor allem auf, daß bei keiner Verbindung in keinem Konzentrationsgebiet das normale Mol.-Gew. beobachtet wird. Dies wirkt sich nicht nur günstig aus für die schon besprochenen größeren Absolutwerte des Effektes in konzentrierter Lösung, sondern auch für die exakte Erkennung der über ein langes Intervall konstanten Zwischenstufen.

4. Neuartig und interessant ist das Verhalten der verzweigten Moleküle, von denen VIII, IX und XI sich völlig normal verhalten, und X einen deutlich schwächeren Effekt gibt. Nach den im nächsten Abschnitt beschriebenen Verhältnissen in Eisessig scheint es sich aber, zumindest bei den Verbindungen X und XI, die ebenfalls je 3 Ringe in gerader

Anordnung enthalten, nur um graduelle, nicht prinzipielle Unterschiede gegenüber den geradlinigen Molekülen zu handeln.

Leider scheinen gerade diese Beobachtungen an den verzweigten Molekülen noch mit einer gewissen Unsicherheit behaftet zu sein, da sich herausgestellt hat, daß die Depressionen in gewissem Grade abhängig sind von der Temperatur, bei der die Lösung hergestellt wird, und daß unter Umständen nach nachträglichem Erhitzen einer kalt hergestellten Lösung größere Depressionen auftreten. Es handelt sich hier ohne Zweifel um gleichartige Verzögerungseffekte, wie sie Hess[1]) an Cello-dextrin-acetaten und Acetylcellulosen beobachtet hat, so daß die von uns bei möglichst niedrigen Lösungstemperaturen gefundenen Depressionen nur Minimalwerte darstellen. Die Verhältnisse sollen in einer anschließenden Untersuchung gesondert nachgeprüft werden.

5. Schließlich ist noch von Interesse, daß sich die Hendekamethyl-cellotriose in Dioxan normal, oder wenigstens nahezu normal verhält. Wie auch aus den Verhältnissen in Eisessig hervorgeht, scheinen danach die Depside, gegenüber den Kohlenhydraten, den Anomalie-effekt bevorzugt zu geben.

C. Messungen in Eisessig.

Der für die Messungen verwandte Eisessig wurde nach der Methode von Hess[2]) gereinigt. Die besten Präparate zeigten in guter Übereinstimmung mit den von Hess angegebenen Daten einen Schmelzpunkt von 16,640°[3]) und eine Leitfähigkeit von $1{,}4—1{,}9 \cdot 10^{-8}\ \Omega^{-1}$ (17°). Wie beim Dioxan wurde auch der Eisessig in verschiedenen Reinheitsgraden, bis herab zum Schmelzp. 16,3°, für die Messungen verwandt.

In Tab. 2 sind nach der gleichen Anordnung, wie oben, die in Eisessig erhaltenen Werte wiedergegeben:

Im wesentlichen ergibt sich das gleiche Bild wie beim Dioxan: Substanz II, IIa, V, VIII, IX und XII verhalten sich normal und bestätigen damit wieder die Synthese und Gefrierpunktsmethode. Alle übrigen Verbindungen liefern anormale Depressionen unter Einhaltung der oben gefundenen Gesetzmäßigkeiten. Es bestehen nur einige, allerdings sehr interessante, graduelle Unterschiede:

1. Die 7-gliedrigen verzweigten Moleküle X und XI verhalten sich in Eisessig ebenfalls anormal und zeigen keinen

[1]) Hess u. Ulmann, A. 504, 81 (1933); B. 68, 134 (1935) u. a.
[2]) Hess u. Haber, B. 70, 2205 (1937).
[3]) Vgl. S. 27, Anm. 1.

Tabelle 2.

Substanz		Konzentrationen in Gew.-%[1]					
		1,0	0,5	0,25	0,10	0,05	0,03
II M = 448	$\Delta t \cdot 10^3$ M gef. M/x ber.	75—80 505 ± 3% M/1 = 448	36 540 ± 4% M/1 = 448	18 540 ± 7% M/1 = 448	8—9 460 ± 10% M/1 = 448	—	—
II a[2] M = 532	Desgl.	57—58 680 ± 3% M/1 = 532	30 650 ± 5% M/1 = 532	19 510 ± 7% M/1 = 532	7—8 520 ± 15% M/1 = 532	—	—
III M = 684	Desgl.	—	28 700 ± 4% M/1 = 684	15—16 630 ± 10% M/1 = 684	8—9 460 ± 15% M · 2/3 = 456	7—8 260 ± 15% M/3 = 228	5 230 ± 20% M/3 = 228
IV M = 920	Desgl.	—	—	—	14—15 270 ± 10% —	8—9 230 ± 15% M/4 = 230	5 230 ± 20% M/4 = 230
V M = 498	Desgl.	—	—	—	8[3] 490 ± 15% M/1 = 498	4[3] 490 ± 30% M/1 = 498	2—3[3] 430 ± 50% M/1 = 498
VI M = 666	Desgl.	—	—	—	—	—	5[3] 235 ± 20% M/3 = 222
VIII M = 708	Desgl.	—	—	15—16 630 ± 10% M/1 = 708	—	< 2 > 650 M/1 = 708	—
IX M = 960	Desgl.	—	—	10 970 ± 10% M/1 = 960	—	1—2 > 800 M/1 = 960	—
X M = 1416	Desgl.	59 663 ± 3% M/2 = 708	30 650 ± 5% M/2 = 708	13 750 ± 10% M/2 = 708	6 650 ± 20% M/2 = 708	6 290 ± 20% —	4[4] 215 ± 30% M/7 = 202
XI M = 1668	Desgl.	—	—	21 460 ± 5% M · 2/7 = 478	8—9 460 ± 12% M · 2/7 = 478	8 245 ± 15% M/7 = 239	—
XII M = 658	Desgl.	—	—	14—15 670 ± 8% M/1 = 658	—	3 650 ± 30% M/1 = 658	—

[1]) Vgl. S. 28, Anm. 1.
[2]) II a = Pentacetyl-digallussäure.
[3]) Vgl. S. 28, Anm. 2.
[4]) In 0,022-proc. Lösung, nicht umgerechnet.

Unterschied mehr gegenüber den Verbindungen mit gerader Kette.

2. Von den geradlinigen Molekülen zeigt die etwas leichter lösliche Verbindung III als einziges Depsid in höherer Konzentration das richtige Mol.-Gew., das dann ebenfalls über nur eine Zwischenstufe auf den Wert eines Ringgliedes herabsinkt. Es ist zu erwarten, daß sich auch die schwerlöslichen Verbindungen IV, VI und VII in höherer Konzentration analog verhalten würden.

3. Im Gegensatz zu der weitgehenden Unabhängigkeit des Anomalie-effektes selbst von Substanz und Lösungsmittel ist anscheinend die Höhe der Zwischenstufe sehr leicht beeinflußbar, und zwar sowohl durch das Lösungsmittel als auch durch geringfügige Konstitutionsänderungen. So zeigt III in Dioxan über ein breites Konzentrationsintervall 45 Proc. des richtigen Mol.-Gew., in Eisessig dagegen $^2/_3$ (vgl. auch Fig. 4), und beim Übergang von X zu XI ändert sich die Zwischenstufe von $^1/_2$ auf $^2/_7$ des theoretischen Wertes. Weiterhin entsprechen die Zwischenstufen nicht nur, wie in Dioxan und bei den Kohlenhydraten, einer scheinbaren Aufteilung des Moleküls in 2 oder 3 Teile, sondern es kommen daneben auch die weniger leicht durch „Dissoziation" erklärbaren Brüche $^2/_3$ und $^2/_7$ vor.

4. Schließlich wurden in keinem Fall irgendwelche Verzögerungseffekte beobachtet, und sämtliche Werte waren streng reproduzierbar, unabhängig davon, bei welcher Temperatur gelöst, bzw. auf welche Temperatur die Lösung nachträglich erhitzt wurde.

Nachdem durch diese Messungen das Auftreten des Anomalie-effektes bei den Depsiden einwandfrei nachgewiesen war, wurde in einer weiteren Versuchsreihe der Übergang zwischen den einzelnen scheinbaren Dissoziationsstufen etwas eingehender untersucht, da infolge des Nichtauftretens der Verzögerungseffekte hier endlich einmal exakte Ergebnisse zu erwarten waren.

Diese Messungen waren für uns besonders deshalb von Interesse, weil derartige Übergänge nach Hess und Ulmann[1]),

[1]) Vgl. S. 30, Anm. 1.

ähnlich einer echten Dissoziation, in einer S-förmigen Kurve verlaufen sollen. Diese konnte jedoch infolge der Verzögerungserscheinungen in den seltensten Fällen messend verfolgt werden und war auch für eine wirkliche Dissoziation recht steil, so daß eine Klärung dieser Verhältnisse erwünscht schien.

Als Untersuchungsbeispiele wurden die auch in konzentrierterer Lösung beständigen Verbindungen III, X und XI ausgewählt, und von jeder dieser Substanzen in mehreren Konzentrationsreihen das für alle charakteristische Konzentrationsgebiet von 0,02—0,3 Proc. in möglichst eng beieinander liegenden Punkten vermessen. Die Ergebnisse sind in Fig. 2, 3 und 4 in logarithmischem Maßstab wiedergegeben, so daß sich auf den schrägen Geraden jeweils die einem konstanten Mol.-Gew. entsprechenden Stufen anordnen.

Zur Ausführung der Konzentrationsreihen von je 4—5 Einzelbestimmungen wurde in das Gefäß *C* (Fig. 1) nach der Blindwertbestimmung etwa 60 Proc. des Lösungsmittels zurückgekippt, mit denen nach Herstellung einer relativ konz. Lösung in den restlichen 40 Proc. nach und nach auf das $2^1/_2$-fache verdünnt werden konnte. Auch der umgekehrte Weg, Herstellung einer Reihe steigender Konzentration durch stufenweises Eingießen einer in *C* hergestellten konz. Lösung in ein bestimmtes Volumen im Gefriergefäß befindlichen Eisessigs, wurde eingeschlagen.

Da sich diese Reihenbestimmungen über den ganzen Tag hinzogen, mußte im temperatur-konstanten Raum gearbeitet werden, wo dann ohne Schwierigkeiten, wie aus der angegebenen Fehlergrenze hervorgeht, in 80—90 Proc. der Fälle die oben beschriebene Genauigkeit von $\pm$ 0,001° erreicht wurde. Die in den verschiedenen Kurven angegebenen Werte stammen jeweils aus mindestens vier sich überschneidenden Konzentrationsreihen und den in Tab. 2 wiedergegebenen Einzelbestimmungen, die alle sehr gut untereinander übereinstimmten.

Als interessantestes Ergebnis wurde beobachtet, daß sich der Übergang zwischen den einzelnen Stufen praktisch bei konstantem osmotischen Druck vollzieht. So bleibt z. B. bei X zwischen 0,035- und 0,12-proc. Lösung Δt konstant auf 0,006° stehen, und auch bei XI und III kann man bei konstantem Druck die Konzentration um den Faktor 2 ändern. Das bedeutet aber, daß es sich hier niemals um eine Dissoziation oder eine analoge Reaktion handeln kann, sondern daß ein grundsätzlich anderer Vorgang stattfinden muß.

So läßt sich z. B. aus dem Ostwaldschen Verdünnungsgesetz berechnen, daß sich der einigermaßen geradlinig verlaufende mittlere Teil der S-förmigen Dissoziationskurven, in dem sich der Spaltungsgrad von 20 auf 80 Proc. erhöht, über ein Konzentrations- und Druckbereich von $1^1/_2$ Zehnerpotenzen erstreckt. Hier findet aber der gesamte Übergang bei konstantem Druck statt oder aber zumindest, da man bei der relativ

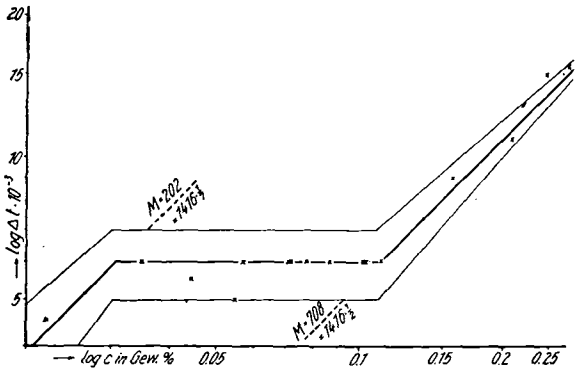


Fig. 2.

Tri-[α-trimethyl-β-diacetyl-digalloyl]phloroglucin M = 1416 in Eisessig.

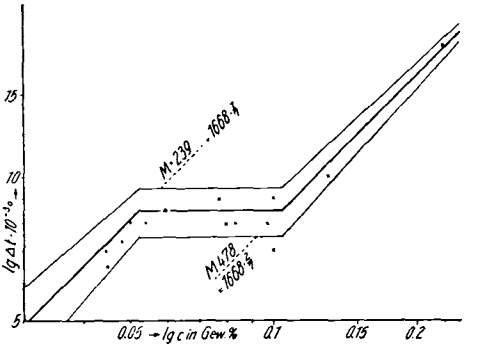


Fig. 3.

Tri-[pentacetyl-digalloyl]phloroglucin M = 1668 in Eisessig.

hohen Fehlergrenze eventuell im Sinne einer S-Kurve liegende Abrundungen der idealisiert gezeichneten Kurven nicht erkennen kann, innerhalb einer Druckschwankung von höchstens 20 Proc.

Der Kurvenverlauf ähnelt vielmehr, wenigstens äußerlich, dem Übergang zwischen 2 Aggregatzuständen bei konstanter Temperatur und veränderlichem Druck: Wie beim

Komprimieren eines Gases steigt beim Konzentrieren der Lösung der osmotische Druck zunächst normal an, um von einem gewissen Umwandlungspunkt an (dem Dampfdruck des Gases entsprechend) so lange konstant zu bleiben, bis sich der dem hohen Druck entsprechende Lösungszustand vollständig in den dem niedrigen Druck entsprechenden Zustand umgewandelt hat (entsprechend der vollständigen Verflüssigung des Gases). Beim weiteren Konzentrieren steigt der Druck dann wieder normal weiter an (etwa der Kompressibilität der Flüssigkeit entsprechend).

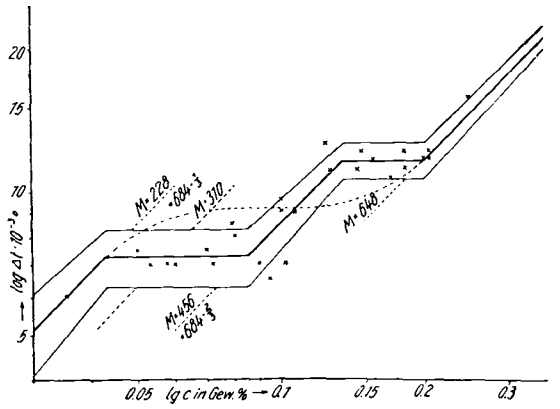


Fig. 4.

α-Trimethyl-β,γ-tetracetyl-trigallusäure M = 684 in Eisessig.

Fig. 4 bietet insofern besonderes Interesse, als hier der einzige Fall vorliegt, in dem der Übergang vom normalen Mol.-Gew. zur vollständigen „Aufteilung" in 2 Stufen verfolgt werden kann. Infolge der dicht aufeinander folgenden Stufen ist allerdings, namentlich der obere Teil der Kurve, nicht so beweisend für den waagerechten Übergang, wie die Übergänge in Fig. 2 und 3, doch läßt sich einwandfrei aussagen, daß die beobachtete Kurvenform nicht durch einen S-förmigen Verlauf (gestrichelt gezeichnet) erklärt werden kann, sondern nur durch Annahme einer Zwischenstufe, und daß diese Zwischenstufe nur dem Mol.-Gew. 456 und nicht, wie in Dioxan, 310 zugeordnet werden kann.

D. Messungen in Bromoform.

Als letztes Lösungsmittel wurde schließlich noch *Bromoform* untersucht, obgleich sich sämtliche Verbindungen hierin außerordentlich schlecht lösen (im Gegensatz zum Chloroform), und sich das gereinigte Bromoform infolge seiner Instabilität bei Lösung der Substanzen in der Hitze leicht zersetzt. Trotzdem waren aber diese Messungen von großem Interesse, da sich nach K. H. Meyer und Hopff[1]) acetylierte Cellodextrine gerade hierin, im Gegensatz zum Eisessig, normal verhalten, also unter Umständen auch für die Depside neuartige Ergebnisse zu erwarten waren.

Das Bromoform des Handels wurde zur Entfernung des zur Stabilisation zugesetzten Alkohols mehrmals mit konz. Schwefelsäure ausgeschüttelt und 24 Stunden über entwässertem Natriumcarbonat stehen gelassen. Nach Vakuumdestillation im Stickstoffstrom zeigte es dann bereits den höchsten in der Literatur[2]) beschriebenen Schmelzpunkt von 7,8°, der sich auch durch andersartige Reinigungsoperationen nicht mehr steigern ließ.

Die beobachteten Werte sind in Tab. 3 wiedergegeben. Leider konnten aus Löslichkeitsgründen keine exakten Bestimmungen der Säuren II und III durchgeführt werden, da sie sich nur in der Hitze und unter teilweiser Braunfärbung des Lösungsmittels auflösten, zum Teil auch in der Kälte wieder auskrystallisierten, so daß keine reproduzierbaren Werte erhalten wurden.

Tabelle 3.

Substanz		Konzentrationen in Gew.-%		
		0,10	0,05	0,025
I M = 212	$t.10^3$ M gef.	65—75 206 ± 10%	—	—
V M = 498	Desgl.	29 498 ± 5%	—	6—7 550 ± 20%
VI M = 666	Desgl.	—	11 660 ± 10%	—
VII M = 970	Desgl.	—	7—8 960 ± 15%	4 900 ± 30%
IV M = 920	Desgl.	—	—	4 900 ± 30%

[1]) B. **63**, 790 (1930).

[2]) Bruni u. Amadori, G. 40 II, 3 (1910).

Trotz der geringen Zahl von Bestimmungen geht aus der Tabelle mit aller Deutlichkeit hervor, daß sich in Analogie zu den Cellodextrinen in Bromoform sämtliche Substanzen normal verhalten und das richtige Mol.-Gew. zeigen. Auch die nicht reproduzierbaren Werte der Verbindungen II und III deuteten in keinem Fall auf das Auftreten anormaler Depressionen hin.

Im Gegensatz zu den Cellodextrinen ist hier aber die Deutung vollkommen eindeutig: Während es sich dort in Bromoform um einen chemisch nicht erfaßbaren, zufälligen Assoziationsgrad handeln konnte und in Eisessig das Mol.-Gew. durchaus bekannter Zuckeranhydride herauskam, tritt hier in Bromoform das durch Synthese genau festgelegte richtige Mol.-Gew. auf, und in Eisessig handelt es sich nur um das chemisch überhaupt nicht realisierte Durchschnitts-Mol.-Gew. eines Bausteines.

Die größte Bedeutung dieses Befundes liegt jedoch in der erneuten Bestätigung der synthetischen Ergebnisse auch durch kryoskopische Messungen. Dadurch, daß ein Lösungsmittel vorhanden ist, in dem sich sämtliche Substanzen normal verhalten, und jetzt alle Substanzen in mindestens einem Lösungsmittel ihr richtiges Mol.-Gew. gezeigt haben, kann das Vorliegen von Mischungen niedermolekularer Substanzen, oder zumindest weitgehende Verunreinigungen definitiv ausgeschlossen werden. Die Gefrierpunktsdepressionen in Dioxan und Eisessig können unter diesen Umständen nicht mehr anders, als im Sinne von Anomalie-effekten gedeutet werden.

E. Ausschluß von Fehlermöglichkeiten.

Bei der Neuartigkeit der beobachteten Effekte war es ein weiteres Erfordernis, auch alle anderen, selbst bei reinen Substanzen auftretenden Fehlerquellen auszuschließen, durch die häufig zu niedrige Mol.-Gew. vorgetäuscht werden. Im folgenden sind daher noch eine Reihe derartiger Möglichkeiten diskutiert:

1. *Verunreinigungen des Lösungsmittels.* Hess[1]) und auch Freudenberg[2]) erörterten früher die Frage, ob die anormalen Molekulargewichte der Cellulosederivate durch geringfügige Verunreinigungen des

[1]) Hess, B. **63**, 518 (1930) u. a.

[2]) Freudenberg, Bruch u. Rau, B. **62**, 3078 (1929).

Lösungsmittels zustande kommen könnten. Wir haben daraufhin sowohl Dioxan als auch Eisessig in verschiedenen Reinheitsstufen angewandt, ohne den geringsten Einfluß auf die Gefrierpunktsdepressionen zu beobachten. Die in den reinsten Lösungsmitteln beobachteten Abweichungen von der theoretischen Depression waren zum Teil erheblich größer als die Entfernung des beobachteten vom theoretisch erreichbaren Schmelzpunkt betrug, so daß Lösungsmittel-verunreinigungen als Ursache des Anomalie-effektes nicht in Frage kommen.

2. An *irreversiblen chemischen Substanzänderungen*, die ein kleines Molekül vortäuschen, kommen nur zwei Möglichkeiten in Frage, Verkrackung und Solvolyse: Erstere ist bei den angewandten niederen Temperaturen äußerst unwahrscheinlich, letztere könnte nur den Effekt in Eisessig, nicht aber in dem chemisch inaktiven Dioxan erklären. Beide Möglichkeiten konnten dadurch exakt ausgeschlossen werden, daß 1. fast alle Substanzen bei der Darstellung aus Eisessig umkrystallisiert wurden und 2. aus der beschriebenen 5-proc. Lösung von III in Dioxan, also einer Lösung, die bereits einen Anomalie-effekt von fast 0,5° gegeben hatte, die ursprüngliche Substanz in guter Ausbeute und völliger Reinheit regeneriert werden konnte.

3. *Radikal- und elektrolytische Dissoziation* stellen schließlich eine letzte Möglichkeit dar, von den Substanzen aus die anormalen Depressionen zu erklären. Erstere kann jedoch der ganzen Natur der untersuchten Verbindungen nach als ausgeschlossen gelten, vor allem fehlt der immer mit der Bildung organischer Radikale verbundene Farbeffekt, und es müßte der Übergang zwischen den einzelnen Dissoziationsstufen dem Ostwaldschen Verdünnungsgesetz gehorchen. Auch wurden bisher niemals Radikaldissoziationen in 4, 5 oder gar 7 Teile beobachtet.

Auch eine elektrolytische Dissoziation erscheint von vornherein sehr unwahrscheinlich. Dagegen spricht, abgesehen davon, daß auch hier das Ostwaldsche Verdünnungsgesetz erfüllt sein müßte, 1. das gleichartige Verhalten aller Verbindungen in Eisessig und dem proteolytisch nahezu naktivem Dioxan, in dem keine auf bekannte Reaktionen zurückführbare Dissoziationsmöglichkeit der neutralen Moleküle V bis XI zu erkennen ist, 2. das gleichartige Verhalten dieser Neutralkörper mit den an sich dissoziationsfähigen Säuren und 3. diesem gegenüber die nicht erklärbaren Unterschiede zwischen den nieder- und hochmolekularen Säuren und den geradlinigen und verzweigten Molekülen.

Trotz dieser zahlreichen Gegenargumente haben wir diese Möglichkeit auch experimentell durch Leitfähigkeitsmessungen nachgeprüft, da sie im Falle des Cellobioseoctacetates von Hess[1]) als Erklärung für die auch hier auftretenden anormalen Depressionen herangezogen wurde, und eine grundsätzliche

[1]) B. **67**, 818 (1934).

Klärung dieser Frage wünschenswert erschien. Allerdings wurden die Messungen nur in Eisessig ausgeführt, da für Dioxan infolge seiner geringen Eigenleitfähigkeit zu komplizierte Apparaturen erforderlich gewesen wären.

Für die Leitfähigkeitsbestimmungen wurde eine, bis auf den Hochvakuummantel, der Gefrierpunktsapparatur analoge Apparatur verwandt, in die statt des Thermometers eine eingeschliffene Elektrode eingesetzt wurde, so daß die Füllung, Substanzauflösung, Verdünnung und Blindwertbestimmung genau wie oben unter Luftabschluß erfolgen konnte. Die Elektrode bestand aus zwei Platinblechen von 6 qcm Fläche und etwa $^1/_2$ *mm* Abstand und besaß infolgedessen eine Widerstandskapazität von nur $7{,}9 \cdot 10^{-3}$, so daß mit der üblichen Brückenanordnung, Widerständen von 10—100000 Ω und einem Telephon als Null-instrument Leitfähigkeiten bis herunter zu 10^{-8} Ω^{-1} mit einer Genauigkeit von etwa 3—5 Proc. gemessen werden konnten. Sämtliche Werte wurden durch Einstellen mit verschiedenen Widerständen bestätigt. Um unter mit den Gefrierpunktsmessungen vergleichbaren Bedingungen zu arbeiten, wurde die Leitfähigkeit bei 17°, statt der sonst üblichen 25°, bestimmt.

Tabelle 4.

Substanz	Konzentrationen in Gew.%	Konzentrationen in Mol/L.10^5	$\varkappa - \varkappa_0 . 10^{9}$ [1])	$\lambda . 10^4$
III	0,286	440	3,8	8,9
	0,237	364	2,1	5,9
	0,192	295	2,0	6,9
	0,113	178	1,7	10
	0,035	54	$<0{,}5$	<10
XI	0,097	61	16,3	270
	0,041	26	10,3	400
Natriumacetat	0,0534	620	686	1100
	0,0283	329	471	1430
	0,0145	168	325	1930
	0,0070	81,5	219	2680
	0,00103	11,9	84	7060
	0,00027	3,1	28	9100

Untersucht wurden lediglich die Substanzen III und XI, von denen erstere als einzige den vollen Übergang vom richtigen Mol.-Gew. zur vollständigen „Dissoziation" erleidet und letztere deshalb von Interesse ist, weil sie in 7 den Strom leitende Ionen zerfallen müßte. Von beiden Substanzen sind

[1]) $\varkappa_0$ schwankte, wie bereits auf S. 30 angegeben, zwischen 14 und 19.10^{-9} Ω^{-1}.

in Tab. 4 die in dem charakteristischen Konzentrationsgebiet von 0,03—0,3 Proc. gemessenen Werte zusammengestellt und mit den, einer Arbeit von Kolthoff und Willmann[1]) entnommenen Werten für Natriumacetat, also einer wirklich leitenden Substanz, verglichen.

Aus dieser Zusammenstellung geht ohne weiteres hervor, daß 1. die Leitfähigkeit der untersuchten Verbindungen ($\varkappa - \varkappa_0$) nur sehr klein ist (meistens kleiner als die Eigenleitfähigkeit des Eisessigs), und daß 2. vor allem diese Leitfähigkeit gerade in dem Konzentrationsgebiet, in dem bei III der Anomalieeffekt überhaupt erst auftritt, und bei XI sich die Zahl der Ionen verdoppeln sollte, ab- statt zunimmt. Auch die geringfügige Zunahme der λ-Werte entspricht nur der bei gleicher Verdünnung gleichen prozentualen Zunahme der Natriumacetat-werte.

Am entscheidensten ist jedoch der Vergleich mit den Natrium-acetatwerten: Stellt man einerseits die λ-Werte bei gleicher molarer Konzentration einander gegenüber, so liegen diese bei unsern Verbindungen etwa um 1—3 Zehnerpotenzen tiefer als bei normalen Salzen. Man müßte also bei Annahme einer vollständigen Dissoziation, unter Mitberücksichtigung der Zahl der Ionen, für XI eine etwa 50- und für III sogar eine etwa 1000-fach geringere Ionengeschwindigkeit annehmen, als beim Natriumacetat, um die geringe Leitfähigkeit zu erklären. Solche geringe Geschwindigkeiten sind aber bei niedermolekularen Ionen nicht bekannt. Demgegenüber ergibt sich auf der andern Seite aus dem Vergleich der Gewichtskonzentrationen bei gleichen $\varkappa$-Werten, daß die geringen Leitfähigkeiten von III und XI ohne Schwierigkeiten bereits durch analytisch kaum nachweisbare Beimengungen von 0,01 bzw. 0,15 Proc. dissoziierbaren Salzes erklärt werden können. Solche Verunreinigungen liegen aber durchaus im Bereich der Möglichkeit und stehen auch in bester Übereinstimmung mit der oben beschriebenen Zunahme der λ-Werte bei Abnahme der $\varkappa$-Werte, so daß das Vorliegen einer elektrolytischen Dissoziation eindeutig als ausgeschlossen gelten kann.

[1]) Am. Soc. **56**, 1010 (1934).

Auch für das Cellobiose-octacetat muß unter diesen Umständen die Möglichkeit einer elektrolytischen Dissoziation abgelehnt werden. Hier liegt ohne Zweifel das erste bisher beobachtete Auftreten des Anomalie-effektes bei 2-gliedrigen Molekülen vor:

Hess schließt aus einer Leitfähigkeitsdifferenz zwischen Maltose- und Cellobiose-octacetat von etwa 5 und zwischen Glucose- und Cellobiose-octacetat von nur $3.10^{-9}\,\Omega^{-1}$ auf vollständige Dissoziation. Das würde ebenfalls nur etwa $^1/_{100}$ der normalen Ionengeschwindigkeit entsprechen, auf der anderen Seite aber, selbst wenn man die volle Leitfähigkeitsdifferenz gegenüber reinem Eisessig von $10.10^{-9}\,\Omega^{-1}$ berücksichtigt, bereits durch eine Beimengung von 0,05—0,1% Natriumacetat erklärbar sein. Die eigenartige Leitfähigkeitskurve der Cellobiose könnte dann dadurch zustande kommen, daß Cellobiose- im Gegensatz zu Maltoseacetat meist in Gegenwart der viel stärker leitenden Schwefelsäure als Katalysator hergestellt wird, die eine viel steilere Leitfähigkeitszunahme mit steigender Verdünnung zeigt und z. B. in esterartiger Bindung, ohne Schwierigkeit als Verunreinigung denkbar ist.

4. Abscheidung von Mischphasen. Die einfachen kryoskopischen Gesetze gelten nur für die Auskrystallisation des reinen Lösungsmittels. Im Falle der Abscheidung von Mischphasen treten jedoch infolge der andersartigen Konzentrationsverschiebungen und Änderungen der Schmelzwärme unübersehbare Komplikationen auf, die für den beobachteten Anomalie-effekt verantwortlich gemacht werden könnten. Abgesehen davon, daß Hess für die hochmolekularen Cellulosederivate diese Möglichkeit durch Messung der osmotischen Effekte über die Dampfphase umgangen hat, haben wir sie auch für unsere Substanzen experimentell ausschließen können:

Die Untersuchung bereitete anfangs insofern Schwierigkeiten, als bei Versuchen, größere Mengen des Lösungsmittels im Eisbad auszufrieren, sich auch bei heftigstem Schütteln an der Gefäßwand eine Kystallschicht abscheidet, aus der die letzten Reste der gelösten Substanz nicht mehr herausdiffundieren können und mit abgeschieden werden, so daß anfangs das ausgefrorene Lösungsmittel immer substanzhaltig erschien. Diese Schwierigkeit ließ sich nur bei dem leicht unterkühlbaren Eisessig dadurch umgehen, daß erst stark unterkühlt und dann außerhalb des Bades durch Schütteln der ganze Kolbeninhalt auf einmal zur Krystallisation gebracht wurde. Die krystallisierte Eisessigmenge konnte dann aus Unterkühlung und Schmelzwärme leicht berechnet werden. Ein derartiger, in einem Rundkolben mit angeschmolzener Glasfrittnutsche ausgeführter Versuch hatte folgendes Ergebnis:

400 mg von Substanz VI in 400 g Eisessig (also einer Konzentration, bei der der Anomalie-effekt auftritt) wurden um 10° unterkühlt, so daß bei einem Verhältnis von spezifischer zu Schmelzwärme von nahezu $^1/_{100}$ etwa 40 g Eisessig auskrystallisierten. Gewicht der Krystalle + anhaftender Mutterlauge: 90 g, Gewicht nach 4-maligem Auswaschen mit 16° warmem Eisessig: 50 g, davon auf Grund des obigen Verhältnisses etwa 22 g noch ungeschmolzene Krystalle und 28 g anhaftende Waschflüssigkeit, die auf Grund einer Bestimmung im Filtrat 1,5 mg Substanz enthielten. Gesamtgehalt von Krystallen + anhaftender Flüssigkeit: 1,8 mg (nach dem Auftauen durch Eindampfen bestimmt). Gesamtmenge der durch Eindampfen zurückgewonnenen Substanz: 392 mg = 98 Proc. Die 22 g gefrorener Eisessig enthielten also nur 0,3 mg gelöste Substanz, etwa $^1/_{80}$ der ursprünglichen Konzentration, ein Wert, der durchaus im Bereich der Fehlergrenzen liegt.

5. *Nicht ideale Verdünnung.* Das Raoultsche Gesetz ist ein Grenzgesetz, das nur in idealer Verdünnung streng erfüllt ist. In konzentrierter Lösung dagegen treten neben der normalen, durch Entropieänderungen bedingten Verdünnungsarbeit noch sekundäre Effekte auf, die durch Änderungen der Solvathülle bei Konzentrationsänderungen, Assoziationseffekte usw. bedingt sein und erhebliche Abweichungen vom Raoultschen Gesetz bewirken können[1]). Auch derartige Effekte können zur Erklärung der von uns beobachteten Erscheinungen nicht herangezogen werden, denn unsere Effekte treten ja gerade erst im Gebiete großer Verdünnung auf und erreichen ihren Höchstwert durchweg erst in etwa 0,05-proc. Lösung, also einem Gebiet, das man praktisch bereits als ideale Verdünnung bezeichnen kann. Dies zeigt folgende einfache Durchrechnung:

Verbindung VII verhält sich in 0,025 proz., bzw. $^1/_{4000}$ normaler Lösung in Dioxan noch einwandfrei anormal. Diese Konzentration entspricht aber einem Gasdruck von nur etwa 4 mm Hg, bzw. es ist ein Molekül von etwa 30 Å Länge und 10 Å Breite in einem Lösungsmittelwürfel von 200 Å Kantenlänge gelöst. Das ist ungefähr dasselbe Verhältnis, als wenn sich ein Goldfischchen von 4 cm Länge in einem Aquarium von 10 Liter Wasser befindet, und es ist kaum anzunehmen, daß in einer solchen Verdünnung die Moleküle noch solche Kräfte aufeinander ausüben bzw. die Solvathüllen noch derart unvollkommen sind, daß dadurch Gefrierpunktsdepressionen bis zum Siebenfachen des theoretischen Wertes zustande kommen.

---

[1]) Vgl. auch S. 43 u. 44, Punkt 3 und 4.

III. Diskussion der Ergebnisse.

Einer ausführlichen Diskussion des beobachteten Materials seien kurz die wichtigsten, in der Literatur beschriebenen analogen Erscheinungen vorangestellt, um etwaige Zusammenhänge mit berücksichtigen zu können:

1. Die Übereinstimmung mit den von Hess und Mitarbeitern an Cellulosederivaten beobachteten Verhältnissen ist in jeder Beziehung so vollkommen (Größe der Abweichung, Auftreten scheinbarer Dissoziationsstufen, Konzentrationsgebiete, Verzögerungserscheinungen usw.), daß es sich ohne Zweifel um den gleichen Effekt handelt und das reichhaltige, an Cellulosederivaten gesammelte Material voll und ganz zur Deutung des neuartigen Effektes mit herangezogen werden kann. Gleichzeitig dürfte durch unsere Versuchsergebnisse der frühere Streit um die Deutung dieses Effektes im Sinne kleiner Moleküle seinen endgültigen, und wohl auch befriedigenden Abschluß gefunden haben.

2. Staudinger und Mitarb.[1]) beobachten an Poly-anetholen und Poly-isopropylbenzolen ähnliche anormale Gefrierpunktsdepressionen, und zwar nur in Naphtalin, während in Benzol das normale Mol.-Gew. gefunden wird. Auch hier ist das Vorliegen eines analogen Effektes wahrscheinlich, doch ist die Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen nicht so vollständig, daß dies mit Sicherheit ausgesagt werden kann. Übereinstimmend ist die Abnahme des Mol.-Gew. mit steigender Verdünnung, ebenfalls hauptsächlich im Konzentrationsgebiet um 0,1 Proc., und in gewissem Sinne auch die Abhängigkeit von der Molekülform, abweichend dagegen der scheinbar stetige Abfall des Mol.-Gew. ohne Auftreten scheinbarer Dissoziationsstufen, das Auftreten von Mol.-Gew. auch unter denen eines Molekülbausteines und das Auftreten des Effektes im höhermolekularen Naphtalin gegenüber dem sich normal verhaltenden niedermolekularen Benzol.

Es ist beabsichtigt, auch hier durch Untersuchung niedermolekularer, synthetischer Modellsubstanzen zu versuchen, den Zusammenhang zwischen beiden Substanzgruppen aufzuklären.

3. Weiterhin haben K. H. Meyer und Lühdemann[2]) an einigen Wachsestern erheblich zu niedrige Mol.-Gew. beobachtet, die ebenfalls bis auf etwa $^1/_3$ des theoretischen Wertes heruntergingen. Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen treten diese Effekte aber nur in ziemlich konzentrierter Lösung auf und nehmen bei steigender Verdünnung bereits weit oberhalb des von uns untersuchten Konzentrationsgebietes bis auf den theoretischen Wert hin ab. Hier liegt ohne jeden Zweifel ein ganz anderer Effekt vor, demgegenüber ein scharfer Trennungsstrich gezogen werden muß.

---

[1]) Staudinger u. Dreher, A. 517, 73 (1935); Staudinger, Kern u. Herrera, B. 68, 2346 (1935).

[2]) Helv. 18, 307 (1935).

4. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den von G. V. Schultze[1]) an Nitrocellulose beobachteten, und auch theoretisch gedeuteten, anormal großen osmotischen Drucken, die allerdings niemals auch nur größenordnungsmäßig die dem scheinbaren Mol.-Gew. einer oder mehrerer C_6-Gruppen entsprechende Werte erreichen. Auch diese Effekte nehmen mit steigender Konzentration zu und sind daher zweifellos auf andere Ursachen zurückzuführen.

Unter Berücksichtigung dieser Literaturangaben lassen sich die beobachteten Tatsachen zu folgenden, zunächst noch rein empirischen Gesetzmäßigkeiten zusammenfassen:

1. In Übereinstimmung mit der schon in der 1. Mitteilung ausgesprochenen Vermutung ergibt sich, daß der beobachtete Effekt lediglich von der Molekülform und nicht von der Molekülart abhängt. Er tritt nach den bisherigen Erfahrungen stets dann auf, wenn die Moleküle aus größeren ringförmigen Bausteinen bestehen, die durch Brückenatome miteinander verbunden sind, eine Form, die man vielleicht am besten als „Perlschnurform" bezeichnet, und ist unabhängig davon, ob die einzelnen Ringglieder durch Ätherbrücken (Kohlenhydrate), Esterbrücken (Depside) oder Paraffinketten (Polyanethole) miteinander verbunden sind. Der Anomalie-effekt selbst besteht dann darin, daß sich diese Perlschnur-moleküle bei einer Kettenlänge von mindestens 3 Gliedern (im Falle der Octacetyl-cellobiose sogar nur zwei) osmotisch so verhalten, als ob die einzelnen Bausteine, oder bei den Zwischenstufen auch Gruppen von Bausteinen, selbständige Moleküle wären. Man kann also direkt von einem osmotischen „Perlschnur-effekt" sprechen.

Eine weitere Abhängigkeit von der Molekülform ist darin zu sehen, daß dieser Perlschnureffekt nur von geradlinigen, nicht aber von den sonst völlig gleichartig aufgebauten verzweigten Molekülen gegeben wird. Erst wenn die Länge der Verzweigungen wieder 3 Glieder erreicht, treten erneut anormale Depressionen, wenn auch in abgeschwächtem Maße, auf.

2. Es besteht ein, allerdings noch nicht völlig durchsichtiger Einfluß des Lösungsmittels, der ebenfalls nicht von der chemischen Natur abhängig ist, denn der Effekt wurde bisher in so verschiedenen Lösungsmitteln, wie Wasser, Eisessig,

[1]) Z. phys. Ch. A. **176**, 317 (1936).

Dioxan und Naphtalin (Polyanethole) beobachtet. Unwirksam ist demgegenüber lediglich Bromoform. Der einzige bisher erkennbare Unterschied besteht in dem höheren Mol.-Gew. des Bromoforms, so daß sich anscheinend die ebenfalls schon früher ausgesprochene Vermutung bestätigt, daß der Perlschnur-effekt nur dann auftritt, wenn das Mol.-Gew. des Lösungsmittels kleiner ist, als das durchschnittliche Bausteingewicht.

Gegen diese Auffassung spricht bisher nur das anormale Verhalten der Polyanethole in Naphtalin gegenüber dem normalen Verhalten in Benzol. Vielleicht spielen hier die im nächsten Punkt beschriebenen Temperatureffekte eine Rolle, so daß Gefrierpunktsmessungen in Naphtalin und Benzol nicht direkt miteinander verglichen werden können.

Wenn auch nicht prinzipiell, so besteht doch vielleicht graduell eine gewisse Abhängigkeit des Effektes von der Verwandtschaft der Substanz zum Lösungsmittel. Z. B. zeigen in Eisessig die mehr esterartigen Verbindungen VI und XI in erwarteter Weise den Anomalie-effekt, während sich die ähnlich gebauten, mehr ätherartigen Verbindungen V und X normal verhalten bzw. erst in größerer Verdünnung und zu einer, einem höheren Mol.-Gew. entsprechenden Zwischenstufe „dissoziieren". Umgekehrt verhält sich in Dioxan XI normal und X „dissoziiert".

3. Als letzte wichtige Gesetzmäßigkeit ergibt sich das Auftreten scharf ausgeprägter, teilweise über ein breites Konzentrationsgebiet konstanter Zwischenstufen, die einfachen Bruchteilen des wirklichen Mol.-Gew. entsprechen und übereinstimmend bei sämtlichen Substanzen und Lösungsmitteln in etwa 0,1—0,05-proc. Lösung zu der höchsten erreichten Stufe übergehen. Dieser Übergang ähnelt in seinem äußeren Habitus viel eher einem Phasenübergang, als einer Dissoziations- oder sonstigen chemischen Reaktion, ein Bild, das in guter Übereinstimmung mit einigen weiteren, von Hess[1]) mitgeteilten Beobachtungen steht: So verläuft der bei acetylierten Cellodextrinen zeitlich verfolgbare Übergang nicht im Sinne einer mono- oder bimolekularen Reaktion, sondern ebenfalls in einer S-förmigen Kurve, und es tritt eine Art Keimbildungs-effekt auf, indem eine Lösung, in der einmal der Perlschnureffekt aufgetreten war, nach Konzentrierung und Rückumwandlung in den Normalzustand, bei erneuter Verdünnung viel rascher „dissoziiert".

[1]) A. 504, 81 (1933).

Man kann danach, vorläufig natürlich nur rein formal, direkt von einem, einer bestimmten Temperatur zugeordneten, osmotischen Umwandlungsdruck sprechen, bei dem verschiedene Lösungszustände ineinander übergehen. Dieser Druck beträgt z. B. bei III etwa 55 mm Hg für die erste Stufe und etwa 32 mm Hg für die zweite Stufe, bei X und XI entsprechend für die zweite Stufe 29 und 41 mm Hg. Aus der Tatsache, daß bei erhöhter Temperatur der Zustand vollständiger „Dissoziation" auch in größerer Konzentration stabil ist, also der Umwandlungsdruck steigt, kann man schließen, daß die Umwandlung in den Zustand höheren Druckes, ähnlich wie die Verdampfung, Wärmezufuhr erfordert.

Versuche, auf Grund dieses Materials bereits jetzt eine umfassende Theorie des beobachteten Effektes aufzustellen, erscheint bei der Kompliziertheit und Neuartigkeit der Erscheinungen verfrüht. Es sollen daher im folgenden nur einige Gedanken und Arbeitshypothesen entwickelt werden, in welcher Richtung eine weitere Klärung der Verhältnisse zu erwarten ist.

Eine erste Möglichkeit der Weiterarbeit ergibt sich aus der oben gegebenen Definition des Begriffes „Perlschnureffekt". Es ist ein unbedingtes Erfordernis, auch andere Substanzgruppen (z. B. den Poly-anetholen analoge, niedermolekulare Verbindungen) und Lösungsmittel auf das Auftreten anormaler Effekte hin zu untersuchen, um zu sehen, bis zu welcher Grenze die hier angenommene Abhängigkeit von der Molekülform und dem Mol.-Gew.-Verhältnis von Lösungsmittel zu Molekülbaustein tatsächlich verwirklicht ist.

Sollte sich hierbei unsere Annahme bestätigen, so liegt es natürlich nahe, den Perlschnur-effekt auch kinetisch so zu erklären, daß sich die einzelnen Molekülbausteine wie freie Moleküle verhalten. Man könnte sich das etwa so vorstellen, daß die einzelnen Ringglieder, oder bei den Zwischenstufen auch Gruppen von Gliedern, die auf Grund ihrer Freiheitsgrade beim Wärmeaustausch mit dem Lösungsmittel aufgenommenen Energiebeträge schneller wieder mit dem Lösungsmittel austauschen, als sie durch die relativ kleinen Brücken über das ganze Molekül verteilt werden.

Diese Hypothese hätte vor allem den Vorteil der Einfachheit und der Zurückführung des Effektes auf bekannte Vorstellungen. Sie würde befriedigend erklären: Den gewiß nicht zufälligen Endwert[1]) der scheinbaren Dissoziation beim Erreichen des durchschnittlichen Baustein-

[1]) Als einzige Ausnahme beobachten Staudinger u. Mitarbeiter (a. a. O.) an Polyanetholen Mol.-Gew., die unter denen eines Bausteines liegen.

gewichtes, die Höhe der scharf definierten Zwischenstufen, die in einfachen Zahlenverhältnissen zum Molekular- bzw. Baustein-Gewicht stehen, und das Verschwinden des Effektes, wenn die Lösungsmittelmoleküle schwerer werden, als der Baustein, wie z. B. in Bromoform. In gleichem Sinne wäre erklärlich die Notwendigkeit des Vorhandenseins perlschnurartiger Moleküle, da bei normalen Fadenmolekülen die CH_2-Bausteine für jedes Lösungsmittel zu klein sind, um kinetisch selbständig zu wirken.

Es sprechen aber auch einige wichtige Tatsachen dagegen. Einmal ist zwar die Höhe, nicht aber das Auftreten der Zwischenstufen in Abhängigkeit von der Konzentration befriedigend zu erklären. Wenn überhaupt eine Konzentrationsabhängigkeit vorhanden ist, so sollte man viel eher einen stetigen Übergang erwarten. Dann ist aber vor allem diese Hypothese thermodynamisch schwer zu deuten. Nach E. Hückel[1]) kommt der osmotische Druck auf rein statistische Weise dadurch zustande, daß beim Konzentrieren, also der Abscheidung des reinen Lösungsmittels, eine Auswählarbeit geleistet werden muß, indem jedes x-te Molekül die Lösung nicht verlassen kann. Da nun aber die einzelnen Bausteine, z. B. in einem 7-gliedrigen Molekül, stets miteinander verbunden sind, können sie im Sinne dieser Vorstellung nur n, nicht aber, wie es für das Zustandekommen des Perlschnureffektes erforderlich wäre, $7 \cdot n$ beliebige Stellen des gerade betrachteten Raumes einnehmen. Hier klafft noch eine wesentliche Lücke.

Man muß also grundsätzlich auch mit der Möglichkeit rechnen, daß der Effekt auf ganz andere Weise zustande kommt und nur zufällig von dieser Größenordnung ist. Da jedoch bei der Unklarheit, die zur Zeit noch immer über das Wesen der osmotischen Erscheinungen selbst besteht, eine Entscheidung, auch in negativem Sinne, nicht gefällt werden kann, soll zunächst an dieser einfachen Vorstellung, die sich als Arbeitshypothese so fruchtbar erwiesen hat, festgehalten werden.

Eine weitere Möglichkeit, dem Wesen des neuen Effektes näher zu kommen, ist in der Untersuchung der Zwischenstufen und deren eigenartigem Übergang ineinander gegeben. Eine Erklärung, wie die beschriebenen Umwandlungen von zweifellos vorhandenen verschiedenen Lösungszuständen in homogener Phase zustande kommen können, kann zwar noch nicht gegeben werden, da, wenigstens soweit uns bekannt ist, irgendwelche Analogiefälle bisher nicht beobachtet wurden. Wir möchten trotzdem die Ähnlichkeit dieser Umwandlungen mit Übergängen von Aggregatzuständen weiterhin im Auge

[1]) Z. El. Ch. **42**, 753 (1936).

behalten und beabsichtigen, vor allem in dieser Richtung weiter zu arbeiten. Insbesondere erscheint es notwendig, einmal durch Verwendung vom Schmelzpunkt unabhängiger, osmotischer Methoden die Temperatur-abhängigkeit des Umwandlungsdruckes und damit die Wärmetönung der Umwandlung zu messen, und dann zu versuchen, derartige Übergänge auch in größeren Konzentrationen aufzufinden und bei der hier viel geringeren Fehlergrenze festzustellen, wie streng diese Analogie zu den Phasenübergängen erfüllt ist, bzw. wie weit die in Fig. 2—4 zunächst scharf angenommenen Ecken im Sinne von S-Kurven abgerundet werden müssen.

Die Untersuchung wird in den verschiedenen angegebenen Richtungen fortgesetzt, und wir bitten, uns hier weiterhin dieses Arbeitsgebiet zu überlassen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, sowie der Münchner Universitätsgesellschaft und der Bayerischen Akademie der Wissenschaften sind wir für Gewährung von Arbeitsmitteln zu großem Dank verpflichtet.

Versuche.

1. Darstellung der Säure-chloride.

Die Säurechloride wurden im Gegensatz zu E. Fischer nach der bequemeren Thionylchlorid-methode hergestellt. Nach 2-stündigem Kochen am Rückfluß war im allgemeinen die Chlorwasserstoff-entwicklung beendet, und das nach dem Abdampfen des Thionylchlorids i. V. auf dem Dampfbad hinterbleibende Rohprodukt krystallisierte meistens bereits spontan aus und war nach 2—3-maliger Umkrystallisation völlig rein.

Das Thionylchlorid muß *rein* sein; bei der Verwendung des technischen Präparates wurde häufig weitgehende Verfärbung und Verkohlung beobachtet.

α-Trimethyl-β-diacetyl-digalloyl-chlorid: Aus 40 g Säure (II) entstanden nach Abdampfen des Thionylchlorides 43 g Rohprodukt, die nach 2-maligem Umkrystallisieren aus hochsiedendem Benzin (Siedep. 110 bis 120°) 37 g reine Substanz lieferten. Schmelzp. 166°.

5,100 mg Subst.: 1,56 mg AgCl.

$C_{21}H_{19}O_{10}Cl$ Ber. Cl 7,61 Gef. Cl 7,57.

Pentacetyl-digalloyl-chlorid: 30 g Pentacetyl-digallussäure[1]) hinterließen nach Abdampfen des Thionyl-chlorides ein schnell krystallisierendes

[1]) E. Fischer u. Mitarbeiter, B. 51, 59 (1918).

gelbes Öl, das durch Auflösen in Aceton und Zugabe von Äther bis zur leichten Trübung 2-mal umkrystallisiert wurde. Reinausbeute: 25 g; Schmelzp. 173°.

α-Trimethyl-β,γ-tetracetyl-trigalloyl-chlorid: 25 g von Säure III ergaben 27 g Rohprodukt, das mehrmals aus viel Tetrachlorkohlenstoff umkrystallisiert wurde. Reinausbeute 18,5 g; Schmelzp. 167°.

2. Ausführung der Synthese.

Es wurde in Anlehnung an die Vorschrift von E. Fischer[1]) folgendermaßen verfahren:

a) *Säuren* (*Substanz II—IV*): 1 Mol Diacetylgallussäure[2]) wird in der zur Lösung notwendigen Menge Aceton gelöst und mit 1 n-Natronlauge genau neutralisiert. Zu dieser Lösung werden nach Innenkühlung auf — 5° unter kräftigem Turbinieren innerhalb 10 Minuten aus zwei Tropftrichtern gleichzeitig je 1 Mol des betreffenden Säurechlorides (ebenfalls in der zur Lösung gerade notwendigen Menge Aceton gelöst) und $^{n}/_{1}$-Natronlauge[3]) zugetropft und dann der ganze Ansatz bis zur Erreichung des Neutralpunktes noch etwa $^{1}/_{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Durch Eingießen in viel Wasser und Ansäuern mit verdünnter Salzsäure wird die Substanz zunächst ölig abgeschieden, sie erstarrt jedoch nach mehrstündigem Stehen und öfterem Durcharbeiten mit dem Glasstab zu einer bröckeligen Masse, die sich leicht absaugen und trocknen läßt. Die Umkrystallisation erfolgte meist aus Eisessig, in einem Fall aus Dioxan.

b) *Neutralkörper* (*V bis XI*): Da in diesem Fall das neutrale Hydrochinon und Phloroglucin als phenolische Komponente fungierten, fiel die anfängliche Neutralisation fort, und die Synthese wurde so ausgeführt, daß das Säurechlorid und Phenol gemeinsam in Aceton gelöst und hierzu unter den oben angegebenen Bedingungen nur die zur Kuppelung erforderliche Menge $^{n}/_{1}$-Natronlauge zutropfen gelassen wurde. Aufarbeitung wie oben.

Substanzen mit etwas zu niedrigem Acetyl-gehalt konnten durch 10-minütliches Kochen mit Pyridin-Essigsäureanhydrid und anschließendes Eindampfen i. V. reacetyliert werden. Ähnlich konnten bei den reinen Äthern mindermethylierte Substanzen durch Behandeln mit Diazomethan in Dioxan auf den vollen Methoxylgehalt gebracht werden.

α-Trimethyl-β-diacetal-digallussäure (*II*): 21,6 g Diacetyl-gallussäure und 18 g Trimethyl-galloyl-chlorid ergaben 36 g Rohprodukt und

---

[1]) B. **51**, 45 (1918).

[2]) A. a. O., S. 56.

[3]) Am besten löst man die berechnete Menge Natriumhydroxyd zu dem gleichen Volumen wie das Säurechlorid, da sich dann das gleichmäßige Zutropfen am besten einregulieren läßt.

nach 3-maligem Umkrystallisieren aus Eisessig 30 g reine Substanz. Schmelzp. 218°.

Methoxylbestg.: 4,817 mg Subst. 6,67 ccm Thiosulfat (n = 0,02891).

$C_{18}H_{11}O_8(OCH_3)_3$ Ber. OCH_3 20,75 Gef. OCH_3 20,67.

Acetylbestg.: 11,285 mg Subst. 4,97 ccm KOH (n = 0,01).

$C_{17}H_{14}O_9(CH_3CO)_2$ Ber. CH_3CO 19,3 Gef. CH_3CO 18,95.

Äquivalentgew.-Bestg.[1]): 1,00 g Subst. 4,21 ccm Na-OCH_3 (n = 0,522).

$C_{21}H_{20}O_{11}$ Ber. Äqu. 448 Gef. Äqu. 454.

α-Trimethyl-β,γ-tetracetyl-trigallussäure (III): Aus 10,9 g Diacetylgallussäure und 20 g α-Trimethyl-β-diacetyl-digalloylchlorid wurden 27 g Rohprodukt erhalten, die nach 4-maligem Umkrystallisieren aus Eisessig 15 g Reinausbeute ergaben. Schmelzp. 223—224°.

Methoxyl: 3,900 mg Subst. 3,20 ccm Thiosulfat (n = 0,03331).

$C_{29}H_{19}O_{14}(OCH_3)_3$ Ber. OCH_3 13,6 Gef. OCH_3 14,1.

Acetyl: 4,888 mg Subst. 2,88 ccm KOH (n = 0,01).

$C_{24}H_{16}O_{13}(CH_3CO)_4$ Ber. CH_3CO 25,2 Gef. CH_3CO 25,3.

Äquivalent: 1,00 g Subst. 2,81 ccm Na-OCH_3 (n = 0,522).

$C_{32}H_{28}O_{17}$ Ber. Äqu. 684 Gef. Äqu. 682.

α-Trimethyl-β,γ,δ-hexacetyl-tetragallussäure (IV): 6,7 g Diacetylgallussäure und 18,5 g α-Trimethyl-β,γ-tetracetyl-trigalloyl-chlorid ergaben 21 g Rohprodukt. Reinausbeute nach 4-maligem Umkrystallisieren aus viel Eisessig: 8 g. Schmelzp. 235°.

Methoxyl: 4,539 mg Subst. 2,59 ccm Thiosulfat (n = 0,03331).

$C_{40}H_{27}O_{20}(OCH_3)_3$ Ber. OCH_3 10,1 Gef. OCH_3 9,83.

Acetyl: 9,951 mg Subst. 6,59 ccm KOH (n = 0,01).

$C_{31}H_{18}O_{17}(CH_3CO)_6$ Ber. CH_3CO 28,05 Gef. CH_3CO 28,45.

Äquivalent: 0,50 g Subst. 1,02 ccm Na-OCH_3 (n = 0,522).

$C_{43}H_{36}O_{23}$ Ber. Äqu. 920 Gef. Äqu. 938.

Di-(trimethyl-galloyl)-hydrochinon (V): Aus 10 g Trimethyl-galloylchlorid und 2,4 g Hydrochinon wurden nach Vorschrift b) 7 g Rohprodukt erhalten, das nach 4-maligem Umkrystallisieren aus Eisessig bei 224° schmolz. Ausbeute 3,5 g.

Methoxyl: 3,693 mg Subst. 9,38 ccm Thiosulfat (n = 0,02884).

$C_{20}H_8O_4(OCH_3)_6$ Ber. OCH_3 37,35 Gef. OCH_3 37,7.

---

[1]) Betreffs Ausführung der Titration vgl. S. 53, Abschnitt 3.

Äquivalent: 0,298 g Subst. 0,09 ccm Na-OCH_3 (n = 0,522).

$C_{26}H_{26}O_{10}$ Ber. Äqu. ∞ Gef. Äqu. 6340
Trimethyl-gallussäure „ „ 212 „ Beimengung: 3,3% als mögliche Verunreinigung.

Di-(triacetyl-galloyl)-hydrochinon (VI): 40 g Triacetyl-galloyl-chlorid und 14,5 g Hydrochinon ergaben 45 g Rohprodukt und nach Umkrystallisieren aus Eisessig bis zur Schmelzpunktskonstanz 15 g reine Substanz. Schmelzp. 250°.

Acetyl: 9,709 mg Subst. 8,89 ccm KOH (n = 0,01).

$C_{20}H_8O_{10}(CH_3CO)_6$ Ber. CH_3CO 38,8 Gef. CH_3CO 39,35.

Äquivalent: 0,300 g Subst. 0,24 ccm Na-OCH_3 (n = 0,522).

$C_{32}H_{26}O_{16}$ Ber. Äqu. ∞ Gef. Äqu. 2400
Triacetyl-gallussäure „ „ 296 „ Beimengung: 8% als mögliche Verunreinigung.

Di-(α-trimethyl-β-diacetyl-digalloyl)-hydrochinon (VII): 6 g α-Trimethyl-β-diacetyl-digalloyl-chlorid und 0,7 g Hydrochinon ergaben 6 g Rohprodukt, die sich kaum mehr aus Eisessig, doch befriedigend aus Dioxan umkrystallisieren ließen. Die Krystallisation geschah allerdings erheblich langsamer (innerhalb 1—2 Tagen), als bei sämtlichen bisher beschriebenen Verbindungen, und es wurden nur äußerst fein krystalline Niederschläge erhalten. Reinausbeute 2,5 g. Schmelzp. 248°.

Methoxyl: 4,219 mg Subst. 7,74 ccm Thiosulfat (n = 0,0200).

$C_{42}H_{24}O_{16}(OCH_3)_6$ Ber. OCH_3 19,18 Gef. OCH_3 18,95.

Acetyl: 10,746 mg Subst. 4,65 ccm KOH (n = 0,01).

$C_{40}H_{30}O_{22}(CH_3CO)_4$ Ber. CH_3CO 17,73 Gef. CH_3CO 18,60.

Äquivalent: 0,379 mg Subst. < 0,01 ccm Na-OCH_3 (n = 0,522).

$C_{48}H_{42}O_{22}$ Ber. Äqu. ∞ Gef. Äqu. > 70000
Trimethyl-diacetyl-digallussäure „ „ 448 „ Beimengung: < 1% als mögliche Verunreinigung.

Tri-(trimethyl-galloyl)-phloroglucin (VIII): 30 g Trimethyl-galloyl-chlorid und 5,5 g Phloroglucin lieferten beim Verdünnen mit Wasser sofort ein krystallines Material (28 g, Schmelzp. 173°), das nach 4-maligem Umkrystallisieren aus Eisessig bei 178° konstant schmolz, doch einen zu geringen Methoxylgehalt hatte. Reinausbeute nach Nachmethylieren mit Diazomethan-Dioxan und weiterer Umkrystallisation: 6 g. Schmelzp. 180°.

Methoxyl: 4,349 mg Subst. 16,63 ccm Thiosulfat (n = 0,0200).

$C_{27}H_9O_6(OCH_3)_9$ Ber. OCH_3 39,4 Gef. OCH_3 39,55.

Äquivalent: 0,370 g Subst. 0,09 ccm Na-OCH_3 (n = 0,522).

$C_{36}H_{36}O_{15}$ Ber. Äqu. ∞ Äqu. 7900
Trimethyl-gallussäure „ „ 212 „ Beimengung: 2,7% als mögliche Verunreinigung.

Tri-(triacetyl-galloyl)-phloroglucin (*IX*): 29 g Triacetyl-galloyl-chlorid und 3,9 g Phloroglucin gaben 30 g Rohprodukt, das 3-mal aus Eisessig umkrystallisiert wurde. Reinausbeute 15 g. Schmelzp. 210°.

Acetyl: 10,256 mg Subst. 9,42 ccm KOH (n = 0,01).

$C_{27}H_9O_{15}(CH_3CO)_9$ Ber. CH_3CO 40,3 Gef. CH_3CO 39,5.

Äquivalent: 1,00 g Subst. 0,25 ccm Na-OCH_3 (n = 0,522).

$C_{45}H_{36}O_{24}$ Ber. Äqu. ∞ Gef. Äqu. 7700
Triacetyl-gallussäure „ „ 296 „ Beimengung: 4% als mögliche Verunreinigung.

Tri-(α-trimethyl-β-diacetyl-digalloyl)-phloroglucin (*X*): Aus 20 g α-Trimethyl-β-diacetyl-digalloyl-chlorid und 1,8 g Phloroglucin wurden 20 g Rohprodukt erhalten, die aus keinem Lösungsmittel zur Krystallisation zu bringen waren. Zur Reinigung durch Umfällen wurde in der etwa 20 fachen Menge Aceton gelöst und vorsichtig bis zur beginnenden Trübung Äther zugesetzt. Über Nacht im Eisschrank schied sich dann die Substanz, äußerlich täuschend einer Krystallisation ähnlich, als körnige Masse an den Gefäßwänden ab, die sich leicht absaugen ließ und mit Äther nachgewaschen wurde. Die amorphe Natur ergab sich, abgesehen von dem Fehlen jeglicher Krystallstruktur auch unter dem Polarisationsmikroskop, eindeutig aus dem Fehlen eines scharfen Schmelzpunktes, statt dessen nur ein bedeutend tiefer als die Schmelzpunkte sämtlicher anderer Substanzen liegendes, etwa 20—30° breites Erweichungsintervall beobachtet wurde. Durch 3—4-maliges Umfällen konnte dieses Erweichungsintervall von etwa 100—130° auf den konstanten Wert von 150—175° gebracht werden. Reinausbeute: 5 g.

Methoxyl: 2,933 mg Subst. 3,27 ccm Thiosulfat (n = 0,03331).

$C_{60}H_{33}O_{24}(OCH_3)_9$ Ber. OCH_3 19,7 Gef. OCH_3 19,2.

Acetyl: 9,970 mg Subst. 4,23 ccm KOH (n = 0,01).

$C_{57}H_{42}O_{27}(CH_3CO)_6$ Ber. CH_3CO 18,22 Gef. CH_3O 18,24.

Äquivalent: 0,507 g Subst. 0,16 ccm Na-OCH_3 (n = 0,522).

$C_{69}H_{60}O_{33}$ Ber. Äqu. ∞ Gef. Äqu. 6100
Trimethyl-diacetyl-digallussäure „ „ 448 „ Beimengung: 7,5% als mögliche Verunreinigung.

Tri-(pentacetyl-digalloyl)-phloroglucin (*XI*): Aus 27,8 g Pentacetyl-digalloyl-chlorid und 2,12 g Phloroglucin wurde 25 g, ebenfalls nicht krystallisierendes Rohprodukt gewonnen. Durch 4-maliges Umfällen mit Aceton-Äther in der angegebenen Weise stieg der Erweichungspunkt ebenfalls auf etwa 150—175° an. Reinausbeute: 5 g.

Acetyl: 8,000 mg Subst. 7,13 ccm KOH (n = 0,01).

$C_{48}H_{15}O_{27}(CH_3CO)_{15}$ Ber. CH_3CO 38,65 Gef. CH_3CO 38,3.

Äquivalent: 0,337 g Subst. 0,14 ccm Na-OCH_3 (n = 0,522).

$C_{78}H_{60}O_{42}$	Ber.	Äqu. ∞	Gef.	Äqu. 4600	
Pentacetyl-digallussäure	„	„ 532	„	Beimengung: 11 %	

als mögliche Verunreinigung.

3. Ausführung der Alkoholat-titration.

Zur Ausführung der Äquivalentgewichtsbestimmung wurden 0,3 bis 1 g Substanz in etwa der 25fachen Menge Chloroform gelöst, mit dem gleichen Volumen Methanol versetzt und der angegebenen Natriummethylat-lösung titriert. Der Umschlagspunkt konnte am schärfsten durch Tüpfeln auf feuchtem, blauem und rotem Lackmuspapier nebeneinander ermittelt werden, da andere Indikatoren infolge des weniger scharfen Umschlagspunktes in alkoholischer Lösung und Trübung durch ausgefallene Natriumsalze mehr oder weniger versagten. Nach jeder Titration wurde von dem gleich zusammengesetzten Methanol-Chloroform-Gemisch der Blindwert ermittelt und abgezogen. Die Fehlergrenze betrug maximal einen Tropfen (0,02 ccm).

Über das Rottlerin. II;

von *Hans Brockmann* und *Karl Maier*.

Mit 4 Figuren im Text,

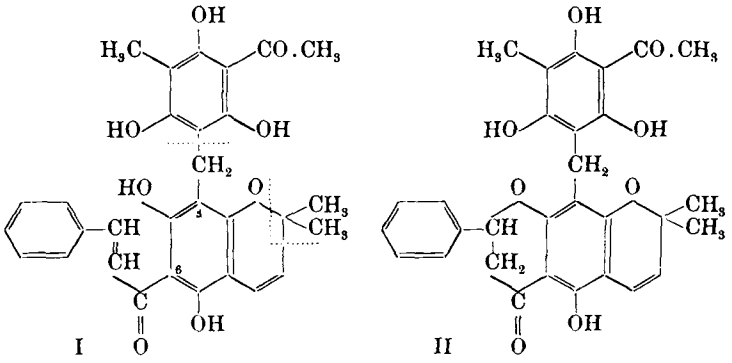
[Aus der Biochemischen Abteilung
des Allgemeinen Chemischen Universitäts-Laboratoriums, Göttingen.]

(Eingelaufen am 7. August 1939.)

Für Rottlerin ist von Robertson[1]) und uns[2]) die Formel I diskutiert worden, in der die Substituenten an C-Atom 6 und 8 des Chromenringes auch gegeneinander vertauscht sein können. Durch Säureeinwirkung konnten wir aus Rottlerin ein Isomeres, das Iso-rottlerin erhalten[2]), dessen Entstehung wir in Parallele gesetzt haben zur Flavanonbildung aus Chalkonen. Auf Grund der Rottlerinformel I sind dann, je nachdem mit welcher OH-Gruppe des Chromenringes der Ringschluß eintritt, 2 Formulierungen für das Iso-rottlerin möglich, von denen

[1]) A. Robertson u. Mitarbeiter, Soc. **1938**, 309.
[2]) A. **535**, 149 (1938).

eine durch II wiedergegeben wird[1]). Inzwischen haben Narang und Mitarbeiter durch Erhitzen von Rottlerin mit alkoholischer Salzsäure ebenfalls Iso-rottlerin erhalten[2]) und es mit einem von ihnen schon früher bei der Rottleringewinnung aufgefundenen Nebenprodukt[3]) identifiziert.



Pseudo-rottlerin und seine Derivate.

Nach unserer Formulierung muß Iso-rottlerin (II) eine OH-Gruppe weniger enthalten als Rottlerin (I). Dementsprechend ergibt die Bestimmung der aktiven H-Atome nach Zerewitinoff-Roth beim Iso-rottlerin einen kleineren Wert als beim Rottlerin[4]). Da uns dieser Befund aber kein ausreichender Beweis dafür erschien, daß beim Übergang von Rottlerin in Iso-rottlerin eine OH-Gruppe verschwindet, haben wir versucht, durch Methylieren (in Aceton mit Dimethylsulfat und Kaliumcarbonat) die Zahl der OH-Gruppen im Iso-rottlerin zu ermitteln.

---

[1]) Bei Annahme der anderen Rottlerinformel (aus I durch Vertauschen der Substituenten an C_6 und C_8 erhalten) ist für Iso-rottlerin nur eine Formulierung möglich.

[2]) H. S. Bakshi, R. S. Jalota, K. S. Narang, J. N. Ray, Current Science **1939**, 165. Bei ihrer Angabe, daß Iso-rottlerin von uns erst nach ihnen aufgefunden ist, übersehen die indischen Autoren, daß wir es in einer vorläufigen Mitteilung [Naturw. **25**, 460 (1937)], damals allerdings noch als Abbauprodukt, beschrieben haben.

[3]) K. S. Narang, J. N. Ray, B. S. Roy, Soc. **1938**, 1862.

[4]) H. Brockmann u. K. Maier, A. **535**, 157 (1938).

Bei diesen Versuchen beobachteten wir sofort nach Zugabe von Kaliumcarbonat zur Acetonlösung des Iso-rottlerins einen auffälligen Farbumschlag von Gelb nach Dunkelbraun. Beim Ansäuern der Lösung wird die Farbe wieder gelb und gleichzeitig fällt in guter Ausbeute eine gelbe, krystallisierte Verbindung aus, die nach mehrmaligem Umkrystallisieren bei 194° schmilzt. Die nähere Untersuchung hat ergeben, daß in dieser Substanz ein neues Isomeres des Rottlerins vorliegt, das im Gegensatz zum Iso-rottlerin in seinen Eigenschaften dem Rottlerin sehr ähnlich ist. So liefert es ebenso wie dieses beim Ozonabbau und beim Kochen mit Alkali *Benzaldehyd*[1]) und läßt sich wie Rottlerin in eine Penta-acetylverbindung $C_{30}H_{23}O_8.(OCCH_3)_5$ überführen, enthält also ebenfalls 5 OH-Gruppen. Ferner ist sein Absorptionsspektrum dem des Rottlerins sehr ähnlich. Wir bezeichnen das neue Isomere daher als Pseudo-rottlerin[2]). Es bildet sich auch, wenn Iso-rottlerin in Aceton mit Alkali behandelt oder in Alkohol mit Natriumacetat erwärmt wird. Der Übergang von Iso-rottlerin in Pseudo-rottlerin ist umkehrbar. Durch Kochen mit Eisessig verwandelt sich das Pseudo-rottlerin wieder in Iso-rottlerin. Dieses entsteht also aus Pseudo-rottlerin unter denselben Bedingungen wie aus Rottlerin.

Iso-rottlerin geht bei der katalytischen Hydrierung mit Palladium in Dihydro-iso-rottlerin über[3]), das sich durch milde Alkalibehandlung ebenfalls in ein isomeres Umwandlungsprodukt, das Dihydro-pseudo-rottlerin überführen läßt. Durch Acetylierung entsteht daraus eine Penta-acetylverbindung $C_{30}H_{25}O_8.(OC.CH_3)_5$ vom Schmelzp. 182°. Analog wie beim Pseudo-rottlerin bildet sich aus Dihydropseudo-rottlerin beim Kochen mit Eisessig wieder Dihydro-iso-rottlerin.

Die Hydrierung des Pseudo-rottlerins mit Palladiumschwarz führt unter Aufnahme von 2 Mol Wasserstoff zu einer Tetra-hydroverbindung $C_{30}H_{32}O_8$ vom Schmelzp. 226°[4]).

[1]) Iso-rottlerin gibt im Gegensatz dazu unter diesen Bedingungen keinen Benzaldehyd.

[2]) In unserer vorläufigen Mitteilung [Naturw. **27**, 259 (1939)] als Umwandlungsprodukt bezeichnet.

[3]) H. Brockmann u. K. Maier, A. **535**, 172 (1938).

[4]) Naturw. **27**, 259 (1939).

Dieselbe Verbindung entsteht bei der Hydrierung des Dihydro-pseudo-rottlerins. Wir bezeichnen dieses Hydrierungsprodukt im folgenden als *Tetrahydro-pseudo-rottlerin.* Es läßt sich in geringer Ausbeute auch durch Hydrierung des Dihydro-iso-rottlerins mit Platinoxyd gewinnen. Ferner kann das Tetrahydro-pseudo-rottlerin auch aus Iso-rottlerin erhalten werden, wenn dieses in Aceton mit Palladiumschwarz bei Gegenwart von Alkali hydriert wird. Bei dieser Darstellungsweise, die präparativ am brauchbarsten ist, handelt es sich in Wirklichkeit um eine Hydrierung des Pseudo-rottlerins, das sich unter der Einwirkung des Alkalis sofort aus Iso-rottlerin bildet. Dagegen entsteht bei der Hydrierung des Iso-rottlerins mit Palladium ohne Alkali, wie schon früher beschrieben, das Dihydro-iso-rottlerin. Es muß jedoch erwähnt werden, daß wir auch unter diesen Bedingungen in einigen Fällen Tetrahydro-pseudo-rottlerin erhielten, ein Befund, auf dessen Deutung weiter unten eingegangen wird.

In ihrer letzten Mitteilung machen Narang und Mitarbeiter kurze Angaben[1]) über 2 Hydrierungsprodukte des Iso-rottlerins vom Schmelzp. 209 und 225—228°. Diese beiden Verbindungen sind zweifellos identisch mit unserem Dihydro-iso-rottlerin bzw. Tetrahydro-pseudo-rottlerin.

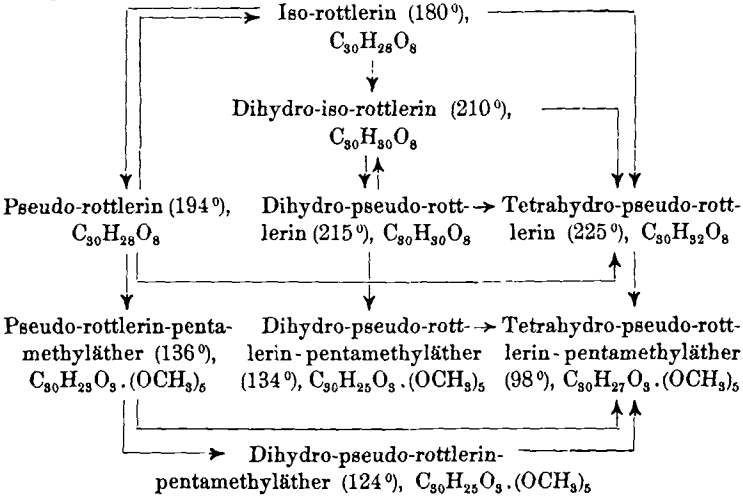
Bei unseren oben erwähnten Methylierungsversuchen haben wir aus Iso-rottlerin einen Penta-methyläther $C_{30}H_{23}O_3.(OCH_3)_5$ vom Schmelzp. 136° erhalten, der bereits von Narang und Mitarbeitern[2]) dargestellt worden ist. Dieses Ergebnis steht scheinbar im Widerspruch zur angeführten Iso-rottlerinformel (II), die nur 4 OH-Gruppen enthält. Da aber nach unseren Versuchen unter den Bedingungen der Methylierung durch das Alkalicarbonat sofort eine Umlagerung des Iso-rottlerins in Pseudo-rottlerin eintritt, in dem ja durch Acetylierung 5 OH-Gruppen nachgewiesen sind, ist die Bildung eines Penta-methyläthers ohne weiteres verständlich. Der Äther ist also nicht, wie die indischen Autoren annehmen, ein Derivat des Iso-rottlerins, sondern ein *Pseudo-rottlerin-pentamethyläther.*

In analoger Weise wie beim Iso-rottlerin entsteht bei der Methylierung des Dihydro-iso-rottlerins ein Penta-methyläther

[1]) Current Science **1939**, 165. [2]) Soc. **1937**, 1862.

$C_{30}H_{25}O_3.(OCH_3)_5$ vom Schmelzp. 134°, der demnach als *Dihydro-pseudo-rottlerin-pentamethyläther* aufzufassen ist. Ein isomerer Äther vom Schmelzp. 124° wurde durch Hydrierung von Pseudo-rottlerin-pentamethyläther mit Palladium bei Gegenwart von Pyridin erhalten. Die Anwesenheit von Pyridin verhindert hier offenbar eine weitere Hydrierung der gebildeten Dihydro-verbindung. Dieselbe Beobachtung machten wir beim Rottlerin-pentamethyläther, den wir bei Gegenwart von Pyridin in eine Dihydro-verbindung überführen konnten, während beim Rottlerin selber unter diesen Bedingungen die Darstellung eines Dihydroderivates mißlang.

Bei der Hydrierung des Pseudo-rottlerin-pentamethyläthers und der beiden isomeren Dihydro-pseudo-rottlerin-pentamethyläther erhielten wir aus allen 3 Verbindungen denselben Tetrahydro-pseudo-rottlerin-pentamethyläther $C_{30}H_{27}O_3.(OCH_3)_5$ vom Schmelzp. 98°. Der gleiche Äther wird in schlechter Ausbeute bei der Methylierung des Tetrahydro-pseudo-rottlerins mit Dimethylsulfat und Alkalicarbonat erhalten. Daneben entsteht ein Methylierungsprodukt vom Schmelzp. 156°, dessen Analysen auf die Formel eines Tetrahydro-pseudo-rottlerin-tetramethyläthers $C_{30}H_{28}O_4.(OCH_3)_4$ passen. Das folgende Schema gibt einen Überblick über die gewonnenen Zusammenhänge.



Wie Tetrahydro-rottlerin liefert das Tetrahydro-pseudo-rottlerin bei Behandlung mit warmer 2 n-Natronlauge eine in wäßrigem Alkali schwer lösliche Verbindung vom Schmelzpunkt 179°. Wegen der Ähnlichkeit mit Tetrahydro-rottleron[1]) in Bildungsweise, Zusammensetzung und Eigenschaften bezeichnen wir dieses Produkt als *Tetrahydro-pseudo-rottleron.* Seine Methylierung führt zu einem Äther vom Schmelzp. 89°, dessen Analysenzahlen annähernd auf die Formel eines Dimethyläthers passen.

Zur Konstitution des Iso-rottlerins und Pseudo-rottlerins.

Es ist noch zu erörtern, wie weit die neuen Befunde mit den angeführten Formulierungen des Rottlerins (I) und Iso-rottlerins (II) zu vereinbaren sind. Zunächst muß kurz auf die Einwände eingegangen werden, die von Narang und Mitarbeitern[2]) gegen diese Formeln erhoben worden sind. Der Methyl-phloracetophenon-rest der Rottlerinformel I ist von uns als Azofarbstoff aus Rottlerin erhalten worden[3]). Im Hinblick auf die Befunde von Boehm[4]) bei Verbindungen der Filixsäuregruppe haben wir eine Verknüpfung des Methyl-phloracetophenon-restes mit dem Chromenring durch eine Methylenbrücke angenommen[5]). Entgegen unserer Annahme, daß die Methyl-phloracetophenon-gruppe als solche im Rottlerin vorliegt, glauben Narang und Mitarbeiter, daß diese Gruppe in einer durch die gestrichelten Linien in Formel I angedeuteten Weise aus dem Chromenring entstanden sein könnte[6]). Wir halten diese Entstehungsweise unseres Azofarb-

[1]) A. Robertson u. Mitarbeiter, Soc. **1937**, 748.

[2]) Current Science **1938**, 607.

[3]) A. **535**, 154 (1938).

[4]) R. Boehm, A. **318**, 262 (1901).

[5]) Daß die verhältnismäßig leichte Sprengung von Methylenbrücken durch Diazo-verbindungen eine allgemeinere Reaktion zu sein scheint, ergibt sich aus den Untersuchungen von H. Fischer u. H. W. Haberland über den Abbau bilirubinoider Verbindungen [H. **232**, 247 (1935)] und von Karasch u. Porsche über die Spaltung von Dinaphtol-methanderivaten, J. organ. Chem. **1**, 265 (1936).

[6]) Nähere Angaben, wie die Entstehung der Acetoxy-gruppe zu denken ist, fehlen.

stoffes für sehr unwahrscheinlich. Unmöglich aber erscheint sie uns beim Tetrahydro-rottlerin, aus dem wir den Azofarbstoff ebenfalls erhalten haben[1]). Gegen das Vorliegen einer Acetyl-gruppe im Rottlerin machen die indischen Autoren weiterhin den negativen Ausfall der Bromoform-reaktion geltend. Da nach neueren Befunden die Haloformprobe bei Substanzen, welche die Acetyl-gruppe an einem o-substituierten Arylrest tragen, negativ ausfällt[2]), kann dieser Einwand nicht als stichhaltig gelten. Dasselbe gilt von den vergeblichen Versuchen zur Darstellung eines Oxims aus dem Pentamethyläther des Rottlerins bzw. Tetrahydro-rottlerins; denn es sind zahlreiche Beispiele dafür bekannt, daß bei Ketonen mit ähnlicher Konstitution wie die Ketongruppierungen im Rottlerin eine Oximbildung ausbleiben oder sehr erschwert sein kann[3]).

Bei Annahme der Rottlerinformel I scheint uns, wie wir in unserer I. Mitteilung dargelegt haben[4]), für das Iso-rottlerin eine Flavanon-formulierung im Sinne von II am besten mit allen Eigenschaften vereinbar zu sein. Es fragt sich nun, wie auf Grund dieser Formel die Entstehung und das Verhalten des Pseudo-rottlerins zu deuten ist. Man könnte zunächst daran denken, daß beim Übergang von Iso-rottlerin in Pseudorottlerin trotz der sehr milden Alkaliwirkung eine Öffnung des Flavanonringes unter Rückbildung der Chalkongruppierung erfolgt. Der Unterschied zwischen Rottlerin und Pseudorottlerin wäre dann auf eine *cis-trans*-Isomerie des Zimtsäurerestes zurückzuführen. Mit dieser Annahme stehen verschiedene Eigenschaften des Pseudo-rottlerins in Einklang, so die Entstehung von Benzaldehyd beim Ozonabbau und beim Kochen mit Alkali, die große Ähnlichkeit der Absorptionsspektren, die Existenz eines Penta-acetates und Penta-methyläthers, das Vorliegen von zwei mit Palladium-Wasserstoff

---

[1]) Herr Prof. A. Robertson war so freundlich, uns brieflich mitzuteilen, daß in seinem Institut vor längerer Zeit der Azofarbstoff aus Tetrahydro-rottlerin ebenfalls dargestellt worden ist.

[2]) R. C. Fuson, B. A. Bull, Chem. Rev. **15**, 275 (1934).

[3]) Zusammenstellung der Literatur in H. Meyer, Analyse und Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen. 6. Aufl. S. 537.

[4]) A. **535**, 158 (1938).

hydrierbaren Doppelbindungen und schließlich die Beobachtung, daß beim Abbau mit Diazo-aminobenzol der gleiche Methyl-phloracetophenon-azofarbstoff gebildet wird wie aus Rottlerin. Wäre aber Pseudo-rottlerin ein *cis-trans*-Isomeres des Rottlerins, so müßte das Tetrahydro-pseudo-rottlerin identisch sein mit Tetrahydro-rottlerin. Das ist jedoch nach unseren Befunden nicht der Fall. Damit ist entschieden, daß die oben angeführte Entstehungsweise des Pseudo-rottlerins durch Ringöffnung nicht in Frage kommt.

Eine Deutung unserer Ergebnisse ohne Annahme einer Ringöffnung scheint uns möglich, wenn man annimmt, daß beim Übergang von Iso-rottlerin in Pseudo-rottlerin im Flavanonring eine Enolisierung der Ketogruppe eintritt, das Pseudo-rottlerin also die Enolform des Iso-rottlerins ist. Eine solche Reaktion kann in Parallele gesetzt werden zur Enolisierung des Toxicarols[1]), bei dem ein Teil des Moleküls ähnlich gebaut ist wie das Rottlerin. Dem Pseudo-rottlerin würde dann die Formel IV und dem aus Dihydro-iso-rottlerin gebildetem Dihydro-pseudo-rottlerin die Formel V zukommen. Die schon durch schwaches Alkali eintretende Bildung der Pseudoverbindungen, ihre leichte Rückverwandlung in die Isoverbindungen, ferner ihre Überführung in die Penta-acetate und Penta-methyläther wird auf Grund dieser Formeln ohne weiteres verständlich.

Daß der aus Iso-rottlerin erhaltene Äther vom Schmelzpunkt 136° der Penta-methyläther des Pseudo-rottlerins (IVa) ist, wurde schon erwähnt. Seine Zusammensetzung kann also keinen Aufschluß über die Zahl der OH-Gruppen im Isorottlerin geben und demnach auch nicht als Argument[2]) gegen die Flavanonformel des Iso-rottlerins angeführt werden. Im Nitrosit des Pentamethyläthers IVa), das von Narang und Mitarbeitern[3]) dargestellt worden ist, muß nach unserer Formel noch eine Doppelbindung enthalten sein. Ihr Nachweis,

---

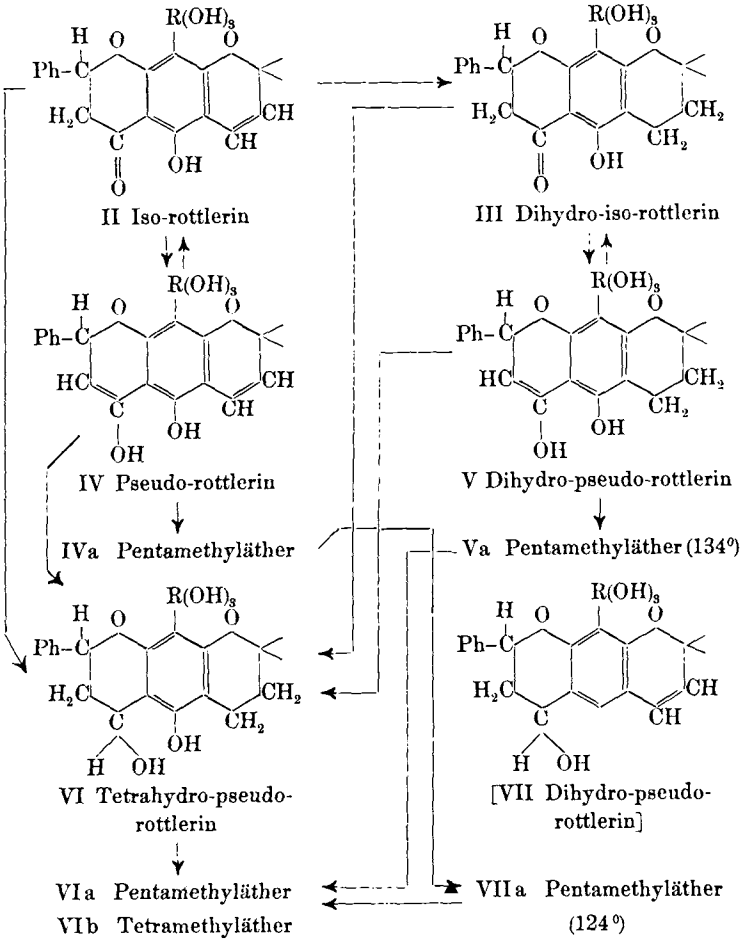
[1]) E. P. Clark, Am. Soc. **54**, 2540 (1932); vgl. auch R. S. Cahn, R. F. Phipers u. J. J. Boam, Soc. **1938**, 734, 513 (Enolisierung von Rotenon).

[2]) Narang u. Mitarbeiter, Current Science **1939**, 165.

[3]) Current Science **1939**, 165.

nach den indischen Autoren die endgültige Widerlegung der Flavanonformel, wird also auf Grund unserer Formulierung gefordert.

Nach den Formeln IV bzw. V muß Pseudo-rottlerin bei der katalytischen Hydrierung mit Palladium 2 Mol, Dihydro-pseudo-rottlerin 1 Mol Wasserstoff aufnehmen, was mit unseren Befunden übereinstimmt. Dem Tetrahydro-pseudo-rottlerin käme dann die Formel VI zu. Seine Entstehung aus Iso-rottlerin durch Hydrierung bei Gegenwart von Alkali verläuft



zweifellos über die Enolform (Pseudo-rottlerin). Daß es bei der Hydrierung mit Platin aus Dihydro-iso-rottlerin (III) entsteht, ist nicht überraschend, da unter diesen Bedingungen die Ketogruppe des Flavanonringes zur OH-Gruppe reduziert werden kann. Ebenso ist es verständlich, daß auch bei der Hydrierung von Iso-rottlerin mit Palladium ohne Alkali gelegentlich das Auftreten von Tetrahydro-pseudo-rottlerin (VI) beobachtet wurde. In diesen Fällen ist die Reduktion der Ketogruppe wohl auf eine besondere Aktivität des Katalysators zurückzuführen.

Die Methylierung von VI liefert, wie erwähnt, einen Pentamethyläther (VIa). Der daneben erhaltene Tetramethyläther vom Schmelzp. 156° verdankt seine Entstehung offenbar der schwereren Methylierbarkeit der sekundären OH-Gruppe.

Die Isomerie der beiden Dihydro-pseudo-rottlerinäther vom Schmelzp. 134 bzw. 124° dürfte ihren Grund darin haben, daß im Äther vom Schmelzp. 134° (Va), wie aus seiner Darstellung hervorgeht, die Doppelbindung des Chromenringes hydriert ist, während bei der Bildung des Isomeren die Wasserstoffanlagerung an der Enoldoppelbindung erfolgt ist (VIIa).

Auch die Entstehung von Benzaldehyd aus Pseudorottlerin, seinem Methyläther, sowie aus Dihydro-pseudorottlerin und dessen Methyläther (Va) scheint uns mit den Formeln in Einklang zu stehen[1]; auffällig ist die gute Ausbeute an Aldehyd.

Iso-rottlerin liefert bei der Behandlung mit Diazo-aminobenzol im Gegensatz zum Rottlerin keinen Azofarbstoff, wofür wir den Ringschluß mit einem zur Methylenbrücke orthoständigen Hydroxyl verantwortlich gemacht haben[2]). Dagegen haben wir aus Pseudo-rottlerin sowie aus seiner Dihydro- und Tetrahydro-verbindung denselben Methyl-phloracetophenon-azofarbstoff erhalten wie aus Rottlerin. Daneben entsteht aus Pseudo-rottlerin noch ein zweiter Azofarbstoff, dessen Analysen dafür sprechen, daß das ganze Molekül mit

[1]) Der Dihydro-pseudo-rottlerin-methyläther (VIIa), in dem die Enol-doppelbindung aushydriert ist, gibt erwartungsgemäß bei der Behandlung mit Alkali keinen Benzaldehyd.

[2]) A. **535**, 162 (1938).

der Diazoverbindung gekuppelt hat. Eine befriedigende Erklärung dafür, daß die angeführten 3 Verbindungen im Gegensatz zum Iso-rottlerin denselben Azofarbstoff liefern wie Rottlerin, können wir nicht geben. Vielleicht ist die verschiedene Konstitution der Ringsysteme von Einfluß auf die Sprengung der Methylenbrücke.

Die Messung der Absorptionsspektren hat folgendes ergeben[1]). Allen untersuchten Verbindungen mit Ausnahme der

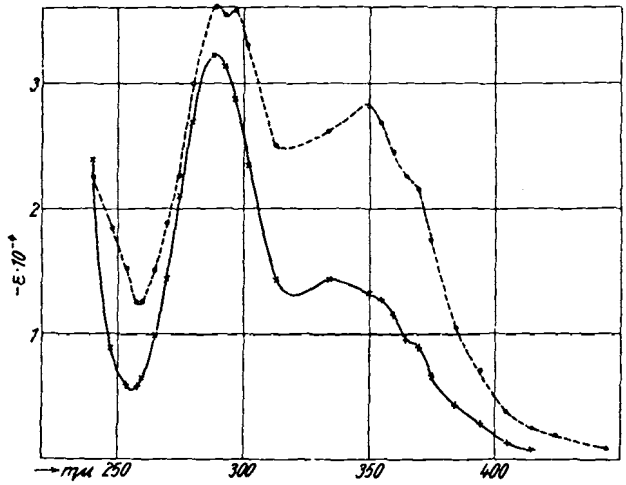


Fig. 1.

○---○---○ Pseudo-rottlerin,

×——×——× Dihydro-pseudo-rottlerin (in Chloroform).

lediglich eine Endabsorption aufweisenden Methyläther des Tetrahydro-rottlerins, Tetrahydro-pseudo-rottlerins (VIa) und des Dihydro-pseudo-rottlerins vom Schmelzp. 124° (VIIa), ist gemeinsam eine Bande mit einem Maximum zwischen 290 und 300 mμ. Im Gegensatz zum Iso-rottlerin zeigt das Pseudo-rottlerin ebenso wie Rottlerin 2 Maxima bei 290 und 350 mμ. Die Enolisierung des Flavanonringes wäre demnach mit einer

[1]) Die Messungen wurden im hiesigen Institut von den Herren Dr. Eckhardt und Diplom-Chemiker Breywisch ausgeführt.

Verschiebung der Absorption ins langwellige Gebiet verknüpft, was in Übereinstimmung steht zu den Befunden an der Enol-

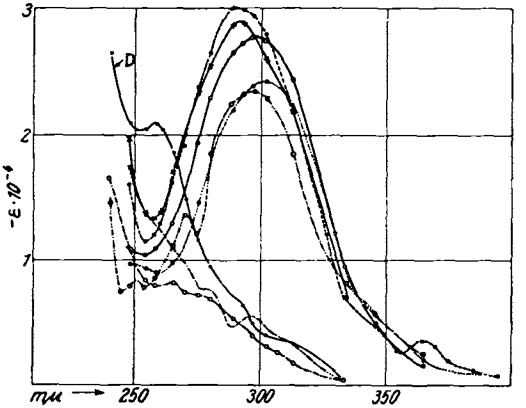
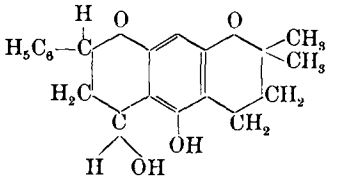


Fig. 2.

×——×——× Rottlerin-pentamethyläther,
○——○——○ Pseudo-rottlerin-pentaacetat,
○····○····○ Dihydro-pseudo-rottlerin-pentaacetat,
○-·-·-·-○-·- Dihydro-pseudo-rottlerin-pentamethyläther (134°),
●---●---● Pseudo-rottlerin-pentamethyläther,
D
·——·——· Dihydro-pseudo-rottlerin-pentamethyläther (124°),
○-·-·○-·-○ Tetrahydro-pseudo-rottlerin-pentamethyläther,
···——···—— Tetrahydro-rottlerin-pentamethyläther (doppelt so großer Maßstab) (in Chloroform).

form des Toxicarols[1]). Im Spektrum des Dihydro-pseudo-rottlerins ist das langwellige Maximum nur schwach angedeutet.

VIII



In Analogie zu der von Robertson[2]) aufgestellten Rottleronformel käme für die aus Tetrahydro-pseudo-rottlerin

[1]) R. S. Cahn, R. F. Phipers u. J. J. Boam, Soc. **1938**, 736.
[2]) Soc. **1938**, 309.

erhaltene und von uns vorläufig als Tetrahydro-pseudo-rottleron bezeichnete Verbindung die Formel VIII in Betracht. Gegen

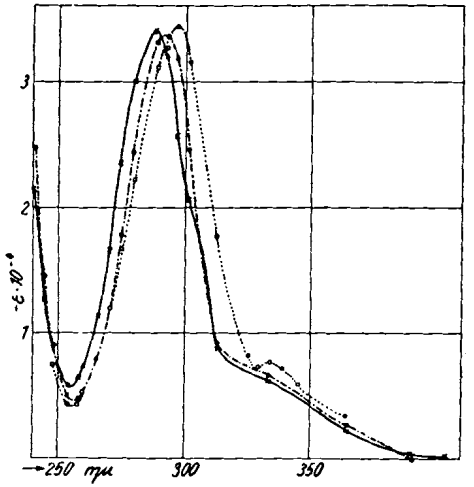


Fig. 3.

○---○---○ Tetrahydro-rottlerin,
×——×——× Tetrahydro-pseudo-rottlerin,
○·-·-○·-·-○ Dihydro-iso-rottlerin (in Chloroform).

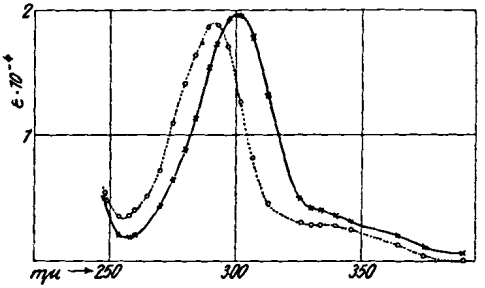


Fig. 4.

×——×——× Tetrahydro-rottleron,
○---○---○ Tetrahydro-pseudo-rottleron (in Chloroform).

die Annahme, daß ein Isomeres des Tetrahydro-rottlerons $C_{20}H_{22}O_4$ vorliegt, sprechen allerdings die Analysenzahlen, die besser auf die Formel $C_{21}H_{24}O_4$ passen. Wie Fig. 4 zeigt, ist

das Spektrum des Tetrahydro-rottlerons dem des Tetrahydro-pseudo-rottlerins ähnlich, die Maxima sind um 10 mμ gegeneinander verschoben.

Beschreibung der Versuche.

1. Pseudo-rottlerin.

960 mg Iso-rottlerin[1]) in 5 ccm Aceton werden mit 1 g wasserfreiem Kaliumcarbonat versetzt. Die gelbe Lösung nimmt in kurzer Zeit einen tief rotbraunen Farbton an. Man erwärmt etwa $^1/_2$ Stunde auf dem Wasserbad, filtriert, wäscht das Carbonat mit einigen Kubikzentimetern Methanol aus, vereinigt das Waschmethanol mit der Acetonlösung und säuert dann diese tropfenweise mit verdünnter Schwefelsäure an (Farbumschlag nach orangegelb). Es fällt ein gelber Niederschlag in Form feiner Nädelchen aus, der sich beim Stehen noch etwas vermehrt (790 mg Rohprodukt). Aus der Mutterlauge scheiden sich manchmal nach mehrstündigem Stehen derbe Krystalle aus, die mit Iso-rottlerin keine Depression geben. Die Ausbeuten an Pseudo-rottlerin schwanken etwas. Geringe Änderungen in Versuchsdauer und Konzentration haben keinen wesentlichen Einfluß auf die Ausbeute.

Pseudo-rottlerin ist ziemlich gut löslich in heißem Chloroform, Chlorbenzol, Dioxan, Aceton, Essigester, Toluol und Xylol, wenig löslich in Benzol und Methanol, unlöslich in Petroläther. In Pyridin löst es sich leicht mit rotbrauner Farbe (wie in Alkalien). Das Umkrystallisieren ist ziemlich verlustreich. Ein großer Teil der Substanz bleibt in Lösung und selbst beim Einengen wird krystallisiertes Material nur noch spärlich erhalten.

Pseudo-rottlerin schmilzt nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Aceton bei 193—194°. Die Mutterlaugen können zur Darstellung des Pseudo-rottlerin-äthers verwendet werden (vgl. unten). Beim Kochen des Pseudo-rottlerins mit 2 n-NaOH entsteht Benzaldehyd. $FeCl_3$ (Alkohol): Grünbraun; konz. Schwefelsäure: Rotbraun.

---

[1]) Die Ausbeute an Iso-rottlerin konnte auf 70 Proc. gesteigert werden. 12 g Rottlerin werden mit 90 ccm Eisessig (p. a.) $1^1/_2$—2 Stunden gekocht. Die Hauptmenge fällt beim Erkalten in derben Krystallen aus; weitere Anteile werden beim Einengen des Eisessigs erhalten. Es erweist sich als zweckmäßig, die späteren Fraktionen auf der Nutsche mehrmals mit Eisessig und anschließend mit Methanol zu waschen.

4,670 mg Subst.: 11,955 mg CO_2, 2,290 mg H_2O.

$C_{30}H_{28}O_8$ Ber. C 69,74 H 5,59 Gef. C 69,82 H 5,49.

Rückverwandlung durch Eisessig. 230 mg Pseudo-rottlerin werden mit 6 ccm Eisessig (p. a.) 70 Minuten gekocht, wobei in kurzer Zeit alles mit braungelber Farbe in Lösung geht. Bald erfolgt dann Farbaufhellung nach Gelb. Man engt ein, worauf sich nach längerem Stehen derbe gelbe Krystalle (175 mg) vom Schmelzp. 179,5—180,5° abscheiden, die mit Iso-rottlerin keine Depression zeigen.

2. Pseudo-rottlerin-pentaacetat.

420 mg Pseudo-rottlerin in 5 ccm trockenem Pyridin werden mit 3 ccm Acetanhydrid versetzt. Die braunrote Farbe der Lösung schlägt sofort in hellgelb um und wird schließlich beim Stehen über Nacht fast farblos. Man verdünnt mit Äther und schüttelt dann mehrmals mit Wasser aus. Es ist notwendig, zuerst den Äther zuzugeben[1]), da sonst bei Zugabe von Wasser eine teilweise Verseifung erfolgt, was sich durch eine ziemlich starke Farbvertiefung nach gelb bemerkbar macht. Nach dem Abdampfen des Äthers wird der Rückstand mit etwas Methanol angespritzt, worauf dieser durchkrystallisiert (500 mg). Aus Methanol und wenig Aceton gelbliche Krystalle vom Schmelzp. 176—177,5° (vorher sintern). $FeCl_3$ (Alkohol): Negativ; konz. Schwefelsäure: Braunrot.

5,077 mg Subst.: 12,345 mg CO_2, 2,410 mg H_2O.

$C_{30}H_{23}O_8 \cdot (CO.CH_3)_5$ Ber. C 66,09 H 5,27 Gef. C 66,32 H 5,31.

Das bei der Hydrierung des Pentaacetats erhaltene ölige Produkt konnte noch nicht zur Krystallisation gebracht werden.

3. Dihydro-pseudo-rottlerin.

455 mg Dihydro-iso-rottlerin in 20 ccm Aceton werden mit 0,5 g wasserfreiem Kaliumcarbonat versetzt und 1 Stunde schwach erwärmt. Wenige Minuten nach Zugabe der Pottasche nimmt die Lösung eine rotstichig braune Farbe an. Aufarbeitung wie bei Versuch 1. Vor dem Ansäuern mit 2 n-Salzsäure wird die Lösung etwas eingeengt. Den gelben Krystallbrei wäscht man mit Wasser und Methanol. Aus Toluol oder

[1]) Ein Acetylierungsversuch des Pseudo-rottlerins, zu welchem bei der Aufarbeitung zuerst Wasser gegeben wurde, lieferte in sehr geringer Menge aus Eisessig ein gelbes, krystallisiertes Produkt, das bei 215—216° schmolz.

Aceton feine gelbe Nädelchen vom Schmelzp. 206—207° (Subst. a).

In einem Versuch wurde aus Toluol ein Präparat (Subst. b) vom Schmelzp. 215—216° erhalten. (Keine Depression mit dem Präparat vom Schmelzp. 207°.) Löslichkeitsverhältnisse wie beim Pseudo-rottlerin. $FeCl_3$ (Alkohol): Schmutzig grünlich; konz. Schwefelsäure: Gelbbraun.

5,200, 4,915 mg Subst.: 13,275, 12,525 mg CO_2, 2,750, 2,640 mg H_2O.

$C_{30}H_{30}O_8$	Ber. C 69 50	H 5,84
	Gef. „ 69,63, 69,50	„ 5,91, 6,01.

Rückverwandlung durch Eisessig. 70 mg Dihydro-pseudo-rottlerin werden mit 2,5 ccm Eisessig (p. a.) 1 Stunde gekocht, wobei die Substanz mit braungelber Farbe in Lösung geht. Während des Kochens erfolgt Aufhellung nach Hellgelb. Man engt ein und behandelt mit Methanol, worauf sich blaßgelbe, feine Krystalle abscheiden (31 mg). Aus Chloroform–Methanol derbe Krystalle, die mit Dihydro-iso-rottlerin keine Depression geben.

4. Dihydro-pseudo-rottlerin-pentaacetat.

100 mg Dihydro-pseudo-rottlerin in 3,5 ccm trockenem Pyridin werden mit 1,5 ccm Acetanhydrid versetzt. Die hellbraune Lösung wird hierbei gelb. Man läßt über Nacht stehen und arbeitet dann wie bei Versuch 2 auf. Aus Methanol sechseckige Platten von blaßgelber Farbe (91 mg), die bei 181—182,5° schmelzen. $FeCl_3$ (Alkohol): Negativ; konz. Schwefelsäure: Rotbraun.

4,839 mg Subst.: 11,685 mg CO_2, 2,440 mg H_2O.

$C_{30}H_{25}O_8.(CO.CH_3)_5$ Ber. C 65,91 H 5,54 Gef. C 65,86 H 5,64.

5. Tetrahydro-pseudo-rottlerin.

a) Durch *Hydrierung von Pseudo-rottlerin.* 100 mg Pseudo-rottlerin in 60 ccm Aceton (p. a.) werden mit 20 mg Pd-Schwarz hydriert, wobei sich ein Teil des Hydrierungsprodukts in blaßgelben, seidigen Nädelchen ausscheidet. Aufarbeitung wie üblich. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Aceton: Schmelzp. 225—226°.

Die Substanz löst sich gut in Pyridin, heißem Aceton, warmem Chloroform und Dioxan; sie ist wenig löslich in Methanol, Äthanol und Benzol, unlöslich in Petroläther und Benzin. $FeCl_3$ (Alkohol): Graugrün; konz. Schwefelsäure: Gelb.

4,920 mg Subst.: 12,495 mg CO_2, 2,750 mg H_2O.

$C_{30}H_{32}O_8$ Ber. C 69,20 H 6,20 Gef. C 69,26 H 6,26.

b) *Durch Hydrierung von Dihydro-pseudo-rottlerin.* 90 mg Dihydro-pseudo-rottlerin in 30 ccm Aceton (p. a.) werden mit 15 mg Pd-Schwarz hydriert. Die braungelbe Lösung wird hierbei blaßgelblich. Aufarbeitung wie üblich. Der Acetonrückstand krystallisiert beim Behandeln mit

Methanol (80 mg). Schmelzpunkt nach Umkrystallisation aus Aceton 225—226°.

c) *Durch Hydrierung von Dihydro-iso-rottlerin.* 500 mg Dihydro-iso-rottlerin in 60 ccm Aceton (p. a.) werden in Gegenwart von 20 mg PtO_2 hydriert. Nach längerer Zeit fallen hellgelbe Nädelchen (220 mg) aus, die nach Umkrystallisieren aus Aceton bei 225—226° schmelzen.

In anderen Ansätzen mit PtO_2 als Katalysator wurde weniger Tetrahydroderivat erhalten, das schwieriger zu reinigen war.

d) *Durch Hydrierung von Iso-rottlerin.* 2,11 g Iso-rottlerin in 25 ccm Aceton (p. a.) werden mit 55 mg Pd-Schwarz in Gegenwart von 150 mg Kaliumcarbonat hydriert. Die hellbraune Lösung wird langsam gelb. Es scheiden sich feine, hellgelbe Nädelchen ab. Nach Zugabe einiger Tropfen verdünnter Schwefelsäure Aufarbeitung wie üblich. Man erhält 1,53 g Hydrierungsprodukt, weitere 200 mg aus der Mutterlauge. Schmelzpunkt (aus Acteon) 225—226°.

Die Präparate aus den Versuchen a—d geben untereinander keine Schmelzpunktsdepression.

Während im allgemeinen bei der Hydrierung des Iso-rottlerins mit Pd (ohne Alkalicarbonat) das Dihydro-derivat (Schmelzp. 210°) erhalten wird, entstand in 2 Fällen unter diesen Bedingungen als Hauptprodukt das Tetrahydro-pseudo-rottlerin, das aus Aceton oder aus Chloroform–Methanol stets in feinen, seidigen Nädelchen auskrystallisiert, während das Dihydro-iso-rottlerin derbe Krystalle bildet. Letzteres ist in Aceton etwas besser löslich als das Tetrahydro-pseudo-rottlerin.

5,197 mg Subst.: 13,190 mg CO_2, 2,900 mg H_2O.

Gef. C 69,22 H 6,24.

6. Pseudo-rottlerin-pentamethyläther.

800 mg Iso-rottlerin, 30 ccm Aceton, 3 ccm Dimethylsulfat und 6 g Kaliumcarbonat werden 6 Stunden unter Rückfluß gekocht, wobei nach 5 Stunden noch 1 ccm Dimethylsulfat und 1 g Kaliumcarbonat zugefügt werden. Den Rückstand der i. V. verdampften Lösung versetzt man mit 500 ccm Wasser, läßt über Nacht stehen, trennt das Ungelöste ab, trocknet und behandelt es mit wenig Methanol, wobei es krystallin wird (530 mg). Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Methanol blaßgelbe quadratische oder rautenförmige Krystalle vom Schmelzp. 135—136°.

Der Äther ist in den meisten organischen Lösungsmitteln, außer in Benzin und Petroläther, gut löslich. $FeCl_3$ (Alkohol): Negativ; konz. Schwefelsäure: Rotbraun.

5,171 mg Subst.: 13,570 mg CO_2, 3,000 mg H_2O. — 3,351 mg Subst.: 6,620 mg AgJ.

$C_{30}H_{23}O_3.(OCH_3)_5$	Ber.	C 71,64	H 6,53	OCH_3	26,44
	Gef.	„ 71,57	„ 6,49	„	26,1.

Verseifungsversuche. a) 180 mg des Äthers, 15 ccm Äthanol und 1 ccm konz. Schwefelsäure werden 2 Stunden unter Rückfluß gekocht, wobei die Lösung sich grün färbt. Nach dem Filtrieren wird bicarbonatalkalisch gemacht, ausgeäthert und der Äther nach Trocknen mit Natriumsulfat verdampft. Beim Anreiben mit wenig Methanol-Petroläther wird der Rückstand krystallin und gibt im Gemisch mit dem Ausgangsmaterial keine Schmelzpunktsdepression.

b) 185 mg Rottlerin-pentamethyläther (Schmelzp. 142°), 10 ccm Äthanol und 2 ccm H_2SO_4 werden $2^1/_2$ Stunden unter Rückfluß gekocht, wobei die Lösung eine gelbliche Farbe annimmt. Man fügt Wasser hinzu, macht bicarbonat-alkalisch und äthert aus. Der Ätherrückstand krystallisiert beim Behandeln mit wenig Aceton und Methanol und gibt im Gemisch mit dem Ausgangsmaterial keine Schmelzpunktsdepression.

7. Dihydro-pseudo-rottlerin-pentamethyläther (Schmelzp. 134°).

750 mg Dihydro-iso-rottlerin, 50 ccm Aceton, 1,5 ccm Dimethylsulfat und 4 g Kaliumcarbonat werden 5 Stunden unter Rückfluß gekocht, wobei nach $1^1/_2$ Stunden noch 4 ccm Dimethylsulfat und 4 g Carbonat zugefügt werden. Die anfangs rotbraune Lösung wird langsam hellgelb. Aufarbeitung wie bei Versuch 6. Aus Methanol kurze, schräge 4-seitige Prismen von blaßgelber Farbe, die sich in den üblichen Lösungsmitteln, außer in Benzin und Petroläther gut lösen. $FeCl_3$ (Alkohol): Negativ; konz. Schwefelsäure: Rotbraun.

4,928 mg Subst.: 12,895 mg CO_2, 3,010 mg H_2O. — 5,047 mg Subst.: 9,960 mg AgJ.

$C_{30}H_{25}O_3.(OCH_3)_5$	Ber.	C 71,39	H 6,85	OCH_3	26,37
	Gef.	„ 71,36	„ 6,84	„	26,07.

8. Dihydro-pseudo-rottlerin-pentamethyläther (Schmelzp. 124°).

330 mg Pseudo-rottlerin-pentamethyläther (136°) in 10 ccm Aceton (p. a.) werden in Gegenwart von 40 mg Pd-Schwarz und 0,1 ccm Pyridin (p. a.) hydriert. Nach Verbrauch von ungefähr 1 Mol H_2 kommt die Aufnahme zum Stillstand. Man filtriert vom Katalysator ab und verdampft das Lösungsmittel i. V. Der Rückstand krystallisiert aus Methanol in farblosen

Stäbchen (280 mg) vom Schmelzp. 123—124°, die in den meisten organischen Lösungsmitteln, außer Petroläther und Benzin, gut löslich sind. $FeCl_3$ (Alkohol): Negativ; konz. Schwefelsäure: Rotbraun.

Beim Kochen mit 2 n-NaOH entsteht kein Benzaldehyd.

5,193 mg Subst.: 13,635 mg CO_2, 3,220 mg H_2O. — 3,562 mg Subst.: 7,240 mg AgJ.

$C_{30}H_{25}O_3.(OCH_3)_5$	Ber. C 71,39	H 6,85	OCH_3 26,37	
	Gef. „ 71,61	„ 6,94	„ 26,85.	

9. Dihydro-rottlerin-pentamethyläther.

397 mg Rottlerin-pentamethyläther (142,5°) in 10 ccm Aceton werden in Gegenwart von 40 mg Pd-Schwarz und 0,11 ccm Pyridin hydriert. Verlauf der Hydrierung wie bei Versuch 8. Der Katalysator wird abfiltriert, das Filtrat mit Äther versetzt und hierauf mit verdünnter Salzsäure, Bicarbonatlösung und Wasser ausgewaschen. Der Rückstand der Ätherlösung scheidet sich aus Methanol in farblosen Krystallen vom Schmelzp. 86—87° ab, die in den meisten organischen Lösungsmitteln außer Petroläther gut löslich sind. $FeCl_3$ (Alkohol): Negativ; konz. Schwefelsäure: Rotbraun. Dihydro-rottlerin-äther gibt mit Tetrahydro-rottlerin-äther keine Schmelzpunktsdepression.

5,107, 4,989 mg Subst.: 13,375, 13,075 mg CO_2, 3,170, 3,070 mg H_2O. — 3,731 mg Subst.: 7,623 mg AgJ.

$C_{30}H_{25}O_3.(OCH_3)_5$	Ber. C 71,39	H 6,85	OCH_3 26,37	
	Gef. „ 71,43, 71,48	„ 6,95, 6,89	„ 26,99.	

10. Tetrahydro-pseudo-rottlerin-pentamethyläther.

a) *Durch Methylierung von Tetrahydro-pseudo-rottlerin.* 410 mg Substanz, 35 ccm Aceton, 3 ccm Dimethylsulfat und 3 g Kaliumcarbonat werden 2 Stunden unter Rückfluß gekocht, wobei man nach 45 Minuten noch 1 ccm Dimethylsulfat zufügt. Die anfangs gelb gefärbte Lösung wird fast farblos. Aufarbeitung wie üblich. Das halbfeste Rohprodukt wird aus wenig Methanol unter Zusatz einiger Tropfen Aceton umgelöst. Es fällt ein farbloser krystalliner Niederschlag aus, der nach Umkrystallisieren aus Methanol und wenig Aceton kleine derbe Krystalle vom Schmelzp. 154—156° liefert. Mischschmelzpunkt mit dem Äther vom Schmelzp. 98° bei 94—96°.

5,113, 5,111 mg Subst.: 13,255, 13,275 mg CO_2, 3,190, 3,210 mg H_2O. — 4,343 mg Subst.: 7,435 mg AgJ.

$C_{30}H_{28}O_4.(OCH_3)_4$	Ber. C 70,80	H 7,00	OCH_3 21,53	
	Gef. „ 70,74, 70,86	„ 6,98, 7,03	„ 22,62.	

Aus der Mutterlauge scheidet sich nach einigem Stehen eine farblose Substanz (65 mg) ab, die nach Umkrystallisieren aus Methanol derbe Krystalle vom Schmelzp. 98° bildet. Keine Depression mit Tetrahydro-pseudo-rottlerin-pentamethyläther aus den Versuchen b—d.

4,747 mg Subst.: 12,415 mg CO_2, 3,050 mg H_2O.

$C_{30}H_{27}O_3 \cdot (OCH_3)_5$	Ber.	C 71,15	H 7,17	OCH_3	26,26
	Gef.	„ 71,33	„ 7,19	„	26,75.

b) *Durch Hydrierung von Pseudo-rottlerin-pentamethyläther.* 135 mg des Äthers werden in 10 ccm Aceton (p. a.) mit 20 mg Palladiumschwarz hydriert. Aufarbeitung wie üblich. Das Hydrierungsprodukt (85 mg) bildet aus Methanol derbe, farblose Krystalle vom Schmelzp. 98°.

c) *Durch Hydrierung von Dihydro-pseudo-rottlerin-pentamethyläther vom Schmelzp. 134°.* 148 mg Äther werden in 15 ccm Aceton mit 20 mg Palladiumschwarz hydriert. Schmelzpunkt des Hydrierungsproduktes nach Umkrystallisieren aus Methanol bei 98°.

d) *Durch Hydrierung von Dihydro-pseudo-rottlerin-pentamethyläther vom Schmelzp. 124°.* 50 mg Äther werden in 10 ccm Aceton mit 20 mg Palladiumschwarz hydriert. Das aus Methanol umkrystallisierte Hydrierungsprodukt schmilzt bei 98°.

11. Ozonabbau.

a) *Pseudo-rottlerin.* Durch eine Suspension von Pseudo-rottlerin in 10 ccm Eisessig (p. a.) wird Sauerstoff, der etwa 6 Proc. Ozon enthält, geleitet, bis die Substanz gelöst und die Lösung blaßgelb geworden ist (6 Stunden). Nach Zugabe von 150 ccm Wasser erhitzt man zur Zersetzung des Ozonids zum Sieden und fängt den mit Wasserdampf übergehenden Benzaldehyd in einer Lösung von p-Nitrophenylhydrazin in verdünnter Essigsäure (1 : 2) auf. Das Hydrazon wird bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Schmelzpunkt des Rohhydrazons: 181° bis 183°; nach einmaligem Umkrystallisieren aus Aceton und wenig Wasser: 184—185,5°; Mischschmelzpunkt mit Benzaldehyd-p-nitro-phenylhydrazon (Schmelzp. 192,5—193°): 189—190°.

125 mg Subst.: 34 mg Hydrazon (umkrystallisiert 21 mg).

$C_{30}H_{28}O_8$ Ber. 1 Mol Benzaldehyd Gef. 0,58 Mol Benzaldehyd.

b) *Dihydro-pseudo-rottlerin.* 130 mg Substanz, suspendiert in 10 ccm Eisessig, werden 6 Stunden ozonisiert. Aufarbeitung wie oben. Schmelzpunkt des Rohhydrazons: 189—190°; nach einmaligem Umkrystallisieren: 191,5—192,5°; Mischschmelzp. 191,8—192,5°.

130 mg Subst.: 48 mg Hydrazon (umkrystallisiert 36 mg).

$C_{30}H_{30}O_8$ Ber. 1 Mol Benzaldehyd Gef. 0,79 Mol Benzaldehyd.

c) *Pseudo-rottlerin-pentamethyläther.* 170 mg Substanz, gelöst in 10 ccm Eisessig, werden 2 Stunden ozonisiert. Aufarbeitung wie oben. Schmelzpunkt des Rohhydrazons: 187—188°; nach einmaligem Umkrystallisieren: 188—190°; Mischschmelzp. 191,8—192,5°.

170 mg Subst.: 53 mg Hydrazon (umkrystallisiert 43 mg).

$C_{30}H_{23}O_3 \cdot (OCH_3)_5$

Ber. 1 Mol Benzaldehyd Gef. 0,76 Mol Benzaldehyd.

d) *Dihydro-pseudo-rottlerin-pentamethyläther* (*134°*). 161 mg Substanz, gelöst in 10 ccm Eisessig, werden 2 Stunden ozonisiert. Aufarbeitung wie oben. Schmelzpunkt des Rohhydrazons 188—191°; nach einmaligem Umkrystallisieren: 191,5—192,5°; Mischschmelzp. 191,5° bis 192,5°.

161 mg Subst.: 58 mg Hydrazon (umkrystallisiert 48 mg).

$C_{30}H_{25}O_3 \cdot (OCH_3)_5$

Ber. 1 Mol Benzaldehyd Gef. 0,88 Mol Benzaldehyd.

e) *Dihydro-rottlerin-pentamethyläther.* 136 mg Äther, gelöst in 10 ccm Eisessig, werden $1^1/_2$ Stunden ozonisiert. Beim Verdünnen mit Wasser fällt eine weiße, zähe Masse aus. Mit Wasserdampf geht kein flüchtiger Anteil über.

12. Spaltung mit Diazoaminobenzol.

a) *Pseudo-rottlerin.* 425 mg Pseudo-rottlerin werden in 160 ccm warmen Aceton gelöst und mit 420 mg Diazo-aminobenzol in wenig Aceton versetzt. Die rotbraune Lösung bleibt zunächst 2 Tage stehen, wird dann 1 Tag auf dem Wasserbad schwach erwärmt und schließlich auf etwa 75 ccm eingeengt. Beim Stehen über Nacht Abscheidung roter Krystalle (49 mg); beim Anreiben Abscheidung eines braunroten Pulvers (77 mg). Engt man weiter ein, so fällt eine Fraktion aus, die nach Umlösung aus Essigester (21 mg) bei 200°, nach weiterem Umkrystallisieren bei 201—204° schmilzt und im Gemisch mit Azofarbstoff aus Rottlerin keine Depression gibt. Mischschmelzp. 204,5—205°. Die beiden ersten Fraktionen, welche in den verschiedenen Lösungsmitteln wesentlich schwerer löslich sind als das Methyl-phloracetophenon-azobenzol, werden vereinigt und in Chloroform gelöst. Ein Teil des Farbstoffs löst sich dabei etwas schwerer. Es wird in der Weise fraktioniert, daß dieser Anteil abgetrennt wird und der etwas leichter lösliche erneut fraktioniert wird. Die Chloroformlösungen werden hierzu eingeengt und in der Wärme mit Methanol angespritzt. Abscheidung feiner roter Krystalle in Form dünner Stäbchen, die von 265° an, ohne zu schmelzen, sich langsam zersetzen. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren stimmt die Analyse annähernd auf ein Pseudo-rottlerin-azobenzol. Der Farbstoff zeigt im Sichtbaren eine verwaschene Bande mit dem Maximum bei ungefähr 505 mμ (in Chloroform).

4,946, 4,824 mg Subst.: 12,725, 12,430 mg CO_2, 2,270, 2,260 mg H_2O. — 3,297 mg Subst.: 0,125 ccm N_2 (22,5°, 758 mm).

$C_{30}H_{27}O_8 \cdot N_2 \cdot C_6H_5$

Ber.	C 69,84	H 5,22	N 4,53
Gef.	„ 70,17, 70,27	„ 5,14, 5,24	„ 4,25, 4,16.

b) *Dihydro-pseudo-rottlerin.* Eine kleine Menge Dihydro-pseudo-rottlerin wird in Aceton gelöst und mit Diazo-aminobenzol versetzt, worauf die Lösung innerhalb kurzer Zeit einen rotbraunen Farbton annimmt. Man läßt über Nacht stehen und engt dann stark ein. Aus dem Niederschlag kann mit Essigester in geringer Ausbeute ein Azofarbstoff (Schmelzpunkt nach Reinigung 200,5—202°) abgetrennt werden, der mit dem Azofarbstoff aus Rottlerin keine Depression gibt.

c) *Tetrahydro-pseudo-rottlerin.* 300 mg Tetrahydro-pseudo-rottlerin werden in 60 ccm heißem Aceton gelöst und mit 300 mg Diazo-aminobenzol versetzt. Man erwärmt die Lösung noch 1 Stunde auf dem Wasserbad und läßt sie dann 2 Tage bei gewöhnlicher Temperatur stehen. Beim Einengen auf ein kleines Volumen fallen Krystalle aus, die ein Gemisch aus rotem Azofarbstoff und wenig gelben Krystallen (Ausgangsmaterial) darstellen. Durch Behandeln mit Aceton und Essigester kann die Farbstofffraktion abgetrennt werden (54 mg); Schmelzp. 199—201°; keine Depression mit dem Azofarbstoff aus Rottlerin.

d) *Tetrahydro-rottlerin.* 1 g Tetrahydro-rottlerin wird in 300 ccm Äthanol heiß gelöst und in der Wärme mit 1 g Diazo-aminobenzol, gelöst in wenig Alkohol, versetzt. Nach Stehenlassen über Nacht engt man auf etwa 50 ccm ein. Die zuerst ausfallende Fraktion ist hell rötlichbraun und liefert beim Umkrystallisieren aus Essigester 145 mg Farbstoff. Bei weiterem Einengen fällt zunächst etwas braunes, amorphes Material aus, das abfiltriert wird. Nach kurzem Stehen scheidet sich ein ziegelrotes Pulver ab, das beim Umlösen aus Essigester noch krystallisierten Farbstoff liefert. Gesamtausbeute 230 mg. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus Essigester Schmelzp. 201—202°; keine Depression mit Rottlerin-Azofarbstoff.

13. Tetrahydro-pseudo-rottleron.

2,42 g Tetrahydro-pseudo-rottlerin werden in 20 ccm 2 n-NaOH gelöst. Die schmutziggelbe Lösung nimmt rasch einen braungelben Ton an. Beim Erwärmen der Lösung auf dem Wasserbad setzt bei 45° eine Trübung ein, die rasch stärker wird und schließlich zur Abscheidung eines gelblichen Produktes führt. Man hält die Temperatur etwa 5 Minuten zwischen 50—60° und vermeidet ein Ansteigen über 65°. Nach dem Erkalten filtriert man ab und wäscht den körnigen Niederschlag mehrmals mit Wasser und anschließend mit Methanol, wodurch gefärbte Verunreinigungen entfernt werden (1,17 g). Hierauf digeriert man den Niederschlag mit wenig warmem Methanol (1,06 g) und krystallisiert dann aus Benzol oder Essigester um (890 mg). Aus den alkalischen Mutterlaugen kann durch häufiges Ausschütteln mit Benzol noch etwas

krystallisiertes Material (127 mg) erhalten werden. Die Verbindung ist gut löslich in warmem Benzol, Toluol, Essigester, Chloroform, Dioxan und Pyridin, wenig löslich in Methanol, Äthanol, Aceton und Eisessig, unlöslich in Petroläther. Zur Analyse wird mehrmals abwechselnd aus Benzol und Essigester umgelöst. Fast farblose dünne Prismen, die bei 170 bis 171° stark sintern und bei 179° klar aufschmelzen. $FeCl_3$ (Alkohol): Graugrün (Tetrahydro-rottleron: Gelbbraun); konz. Schwefelsäure: Gelb; die fast farblose Lösung in Essigsäureanhydrid wird auf Zusatz von Boressigsäureanhydrid intensiv citronengelb.

4,751, 5,112, 5,097 mg Subst.: 12,910, 13,915, 13,845 mg CO_2, 2,850, 3,050, 3,060 mg H_2O.

$C_{20}H_{22}O_4$	Ber.	C 73,58	H 6,80
$C_{21}H_{24}O_4$	,,	,, 74,08	,, 7,11
	Gef.	,, 74,11, 74,26, 74,13	,, 6,71, 6,68, 6,72.

Methylierung. 300 mg Tetrahydro-pseudo-rottleron, 50 ccm Aceton, 2 ccm Dimethylsulfat und 5 g wasserfreies Kaliumcarbonat werden 4 Stunden unter Rückfluß gekocht, wobei nach $2^1/_2$ Stunden noch 2 ccm Dimethylsulfat und 3 g Carbonat zugefügt werden. Aufarbeitung wie bei Versuch 6. Der in sehr kleiner Menge gebildete Äther ist zunächst ölig und wird bei längerem Stehen und durch Behandlung mit Methanol–Petroläther fest. Zur Analyse löst man mehrmals aus Methanol um. Schmelzp. 87—89°.

5,001 mg Subst.: 13,775 mg CO_2, 3,180 mg H_2O. — 3,588 mg Subst.: 5,052 mg AgJ.

$C_{20}H_{20}O_2 \cdot (OCH_3)_2$	Ber.	C 74,53	H 7,40	OCH_3 17,5
$C_{21}H_{22}O_2 \cdot (OCH_3)_2$	,,	,, 74,96	,, 7,66	,, 16,9
	Gef.	,, 75,12	,, 7,12	,, 18,5.

Methylierungsversuche mit Methyljodid–Kaliumcarbonat–Aceton verliefen ebenfalls unbefriedigend.

Der Justus-Liebig-Gesellschaft zur Förderung des chemischen Unterrichtes, insbesondere Herrn Prof. Dr. H. Hörlein, ist der eine von uns (K. M.) für die Gewährung eines Stipendiums zu Dank verpflichtet.

Über das β-Methyl-fructo-furanosid;

von *Hans Heinrich Schlubach* und *Heinz Eike Bartels*.

[Mitteilung aus dem Chem. Staatsinstitut Hamburg, Universität.]

(Eingelaufen am 10. August 1939.)

Im Jahre 1925 beobachteten H. H. Schlubach und G. Rauchalles[1]), daß von einem Methyl-fructosidgemisch, das R. C. Menzies[2]) durch kurzdauernde Einwirkung methanolischer Salzsäure auf Fructose erhalten hatte, eine Komponente, und zwar eine linksdrehende, durch Invertin ebenso leicht gespalten wird wie Rohrzucker. Sie haben deshalb das Invertin als das Ferment bezeichnet, das in spezifischer Weise Glycoside der β-Reihe der h-Fructose, die später von W. N. Haworth als Fructo-furanose erkannt wurde, zu hydrolysieren vermag. Diese Auffassung über die Natur des Invertins ist insbesondere von R. Weidenhagen[3]) aufgenommen und in eingehenden Untersuchungen erweitert worden.

Da die erwähnte Untersuchung von einem Gemisch ausging, stand noch der Nachweis aus, daß ein reines β-Glykosid der Fructo-furanose durch Invertin ebenso vollständig gespalten wird wie Rohrzucker.

In weiterer Auswertung des Befundes von H. H. Schlubach und G. Rauchalles haben C. B. Purves und C. S. Hudson[4]) aus dem Teil des Fructosidgemisches, der bei der Einwirkung des Invertins unangegriffen bleibt, das α-Methyl-fructo-furanosid in krystallisierter Form isolieren können, Versuche dieser Forscher, durch fraktionierte Verteilung aus diesem Gemisch die gegen Invertin unbeständige Form herauszuarbeiten, haben nicht zu dem gewünschten Erfolg geführt.

Für die Gewinnung des β-Methyl-fructo-furanosids haben wir deshalb die gleiche Methode zur Grundlage gewählt, der

[1]) B. **58**, 1842 (1925).
[2]) Soc. **121**, 2238 (1927).
[3]) Z. d. Ver. dt. Zuckerind. 82ff.
[4]) Am. Soc. **56**, 708 (1934).

sich W. T. J. Morgan[5]) und R. Robison bedient haben. Diese Forscher hatten aus den beiden Methyl-fructosid-diphosphorsäuren, die in Gestalt ihrer Barium- oder Brucinsalze von W. T. J. Morgan[6]) durch Auseinanderfraktionierung des Gemisches erhalten waren, mit Hilfe einer Knochenphosphatase die Phosphorsäure abspalten können, ohne daß die Glycosidbindung angegriffen wurde und so das α- und das β-Methyl-fructo-furanosid gewonnen. Daß der Reinheitsgrad dieser beiden Verbindungen allerdings kein sehr hoher war, ließ der Vergleich der Konstanten des von ihnen beschriebenen α-Methyl-fructo-furanosids mit denjenigen der gleichen, später von C. B. Purves und C. S. Hudson auf dem oben erwähnten Wege in krystallisierter Form erhaltenen Verbindung erkennen, da von ersteren eine maximale Drehung von $[\alpha]_{5461} + 64^0$ angegeben, von letzteren eine solche von $[\alpha]_D + 93{,}05^0$ gemessen wurde.

Wir haben nun das β-Methyl-fructo-furanosid grundsätzlich nach der gleichen Methode wie Morgan gewonnen, jedoch unter Anwendung aller Vorsichtsmaßnahmen, wie sie bei einer so labilen Verbindung auf Grund der inzwischen vertieften Erfahrungen geboten erscheinen. So wurde zunächst das technische Candiolin, von dem wir ausgingen, durch Umkrystallisation seines Brucinsalzes praktisch vollständig von der Aldosekomponente befreit. Ein Versuch, dieses reine Brucinsalz direkt ins Glycosid überzuführen, erwies sich als undurchführbar, da die Methylierung nur langsam und unvollständig verlief. Es mußte deshalb zunächst in das Bariumsalz zurückverwandelt werden, das dann unter den von Morgan angegebenen Bedingungen mit methanolischer Salzsäure in das Gemisch der beiden Methyl-fructosid-diphosphorsäuren übergeführt wurde. Eine direkte Aufteilung der Brucinsalze dieses Gemisches erwies sich ebenfalls als unmöglich. Erst nach vorangegangener weitgehender Trennung der Bariumsalze, erneuter Rückumwandlung in die Brucinsalze und fraktionierter Krystallisation der letzteren konnte eine weitgehende

---

[5]) Biochem. J. **22**, 1270 (1928).
[6]) Biochem. J. **21**, 675 (1927).

Zerlegung des Gemisches erreicht werden. Als Drehungen der reinsten Bariumsalze wurden gemessen für:

α: $[\alpha]_D = +8{,}5^0$ [Morgan $+6{,}95^0$ [1])],

β: $[\alpha]_D = -8{,}75^0$ [Morgan $-8{,}81^0$ [1])].

Abweichend von Morgan wurde die Abspaltung der Phosphorsäure mit Hilfe einer nach der Vorschrift von H. und E. Albers[2]) bereiteten wirksamen Nierenphosphatase durchgeführt. Die auf diese Weise erhaltenen Methylfructoside wurden zur weiteren Reinigung nach Purves und Hudson acetyliert, destilliert und entacetyliert.

Bei dem auf diesem Wege erhaltenen β-Methyl-fructo-furanosid wurde eine Drehung von $(\alpha)_D^{20} = -49{,}95^0$ (Wasser, $c = 1$) gemessen, ein Wert, der mit dem von Purves und Hudson aus der Invertinspaltung des Gemisches errechneten von $(\alpha)_D = -52 \pm 2^0$ gut übereinstimmt. Der von Morgan und Robison erhaltene tiefste Wert hatte $(\alpha)_D = -43{,}2^0$[3]) betragen.

Dieses β-Methyl-fructo-furanosid ließ sich durch Invertin zu 95,1 Proc. spalten. Wenn die Hydrolyse nicht 100 Proc. erreichte, so dürfte dies auf einen geringen Rest von unverseifter Tetraacetylverbindung zurückzuführen sein, dessen vollständige Abtrennung nicht gelang. Eine Säurespaltung ergab dementsprechend ebenfalls nur einen Höchstwert von 97,2 Proc. Es ist aber damit nachgewiesen, daß das β-Methyl-fructo-furanosid praktisch vollständig durch Invertin gespalten werden kann. Die Annahme von H. H. Schlubach und G. Rauchalles hat daher ihre volle Bestätigung gefunden. Daß das Invertin nur spezifisch hinsichtlich der Zuckerkomponente des Substrates, nicht hinsichtlich des Aglycons wirkt, ergibt sich aus den Beobachtungen von C. B. Purves und C. S. Hudson[4]), daß auch das β-Benzyl-fructo-furanosid durch seine Einwirkung gespalten wird.

Damit finden die Schlüsse, die seinerzeit hinsichtlich der Konfiguration des Rohrzuckers gezogen waren, ihre endgültige Bestätigung. *Rohrzucker ist eine α-Gluco-pyranosido-β-fructo-*

---

[1]) Umgerechnet aus $(\alpha)_{5461}$: 1,18.

[2]) H. **232**, 189 (1935).

[3]) Umgerechnet aus $(\alpha)_{5461}$: 1,18.

[4]) Am. Soc. **59**, 49 (1937).

furanose. Von H. Pringsheim[1]) ist zugunsten der Annahme einer α-glycosidischen Bindung der Fructose-komponente im Rohrzucker auf die Angabe von Morgan hingewiesen, daß von den beiden Methyl-fructosid-diphosphorsäuren das α-Isomere zu 25—30 Proc., daß β-Isomere nur zu 7 Proc. durch Invertin gespalten wird. Wir haben diese Versuche nachgearbeitet und gefunden, daß bei 17-stündiger Einwirkung eines sehr aktiven Invertinpräparates weder die α- noch die β-Komponente in meßbarem Umfange angegriffen werden.

Auch aus der von E. Berner[2]) gemachten Beobachtung, daß bei der Methanolyse des Rohrzuckers bei 150° ein Methylfructosid mit einer Drehung von $[\alpha] + 54^0$ erhalten wird, kann unseres Erachtens ebenfalls nicht gefolgert werden, daß der Fructoseteil im Rohrzucker α-glycosidisch gebunden ist, denn bei der leichten thermischen Isomerisierbarkeit der Methylfructoside ist die primär entstandene Verbindung bei der Höhe der angewandten Temperatur und der langen Dauer der Einwirkung in das unter diesen Bedingungen stabile Gleichgewichtsgemisch übergegangen.

H. H. Schlubach und G. Graefe[3]) haben die Erwartung ausgesprochen, daß der Unterschied in den Hydrolysengeschwindigkeiten von Derivaten der Keto-pyranosen und der Keto-furanosen nicht so groß sein würde wie zwischen den entsprechenden Verbindungen der Aldosen und im Gegensatz zu diesen, bei denen er etwa *zwei* Zehnerpotenzen beträgt, nur etwa *eine* Zehnerpotenz ausmachen würde. Diese Annahme hat im Falle der Methyl-fructoside der β-Reihe ihre Bestätigung gefunden. Während nämlich die H.U.Z. bei dem β-Methyl-fructo-pyranosid 415 Minuten beträgt[4]), wurden bei dem β-Methyl-fructo-furanosid 52,5 Minuten gemessen. Zum Vergleich wurde auch von dem krystallisierten α-Methyl-fructo-furanosid von Purves und Hudson die H.U.Z. unter Normalbedingungen bestimmt und zu *34* Minuten gefunden. Dieser Wert stimmt gut mit demjenigen überein, der sich

[1]) Die Polysaccharide **1931**, 44.
[2]) B. **66**, 1076 (1933).
[3]) A. **532**, 219 (1937).
[4]) A. **532**, 227 (1937).

aus dem von C. B. Purves[1]) unter anderen Bedingungen gemessenen Zahlen für die Hydrolysengeschwindigkeiten des α-Methyl-fructo-furanosids und des Rohrzuckers errechnen läßt. Denn hiernach sollten sich die Spaltungsgeschwindigkeiten dieser beiden Verbindungen wie 8,1 : 1 verhalten. Da die H.U.Z. des Rohrzuckers mit 291 Minuten bestimmt wurde, errechnet sich nach diesem Verhältnis für das α-Methyl-fructo-furanosid *35,9* Minuten.

Während bei den Pyranosiden der Aldosen vielfach[2]) festgestellt ist, daß die Glycoside der β-Reihe etwa doppelt so schnell hydrolysiert werden wie diejenigen der α-Reihe, ist hier der Unterschied geringer und liegt ebenso wie bei den Fructo-pyranosiden in umgekehrter Richtung, denn bei beiden Paaren wird das α-Isomere leichter gespalten als die analoge Verbindung der β-Reihe, eine neue Bestätigung für die schon mehrfach hervorgehobene Tatsache, daß sich die Verhältnisse der Aldosen nicht ohne weiteres auf diejenigen der Ketosen übertragen lassen.

Beschreibung der Versuche.

Reinigung des Candiolins.

Für das von der I. G. Farbenindustrie A.-G., Werk Elberfeld in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellte Präparat waren die folgenden analytischen Daten angegeben:

	Gef.	Ber.
H_2O	15,41	
Ca	17,05	19,27
P (org.)	13,21	14,92
P (anorg.)	0,29	

Der Aldosewert betrug 3,2—3,5 Proc. Er wurde nach Auerbach-Bodländer gemessen, indem etwa 500 mg Candiolin mit wenig Wasser und 5 ccm $^n/_1$-Schwefelsäure versetzt, nach kurzer Zeit mit der äquivalenten Menge $^n/_{10}$-Natronlauge neutralisiert und der Aldosewert ohne Rücksicht auf das ausgefallene Sulfat bestimmt wurde.

48,0 g Candiolin = 41,6 g wasserfreie Verbindung = $^1/_{10}$ Mol wurden in 500 ccm Wasser aufgeschlämmt und im Verlaufe von 10 Minuten mit 400 ccm $^n/_{10}$-Oxalsäure versetzt. Nach Absitzen wurde durch Dekantieren und Zentrifugieren vom ausgefallenen Calciumoxalat getrennt und 186 g

[1]) Am. Soc. **56**, 1969 (1934).

[2]) Vgl. z. B. H. H. Schlubach u. G. Graefe, A. **532**, 218 (1937).

Brucin, gelöst in 500 ccm Äthanol, zugegeben. Beim Mischen trat sogleich eine Braunfärbung der Lösung ein. Nach 24 Stunden Stehen auf Eis wurde abgenutscht und durch Aufnehmen in der 7—8-fachen Menge siedenden 70-proc. Äthanols und sofortiges Abkühlen umkrystallisiert. Nach 5-maliger Wiederholung der Operation war die Verbindung praktisch aldosefrei. $(\alpha)_D = -23{,}6^0$. Ausbeute 65—75 Proc.

Umwandlung in das fructose-diphosphorsaure Barium.

80 g trockenes Brucinsalz wurden in 1100 ccm 20-proc. Äthanol aufgeschlemmt, eine konzentrierte wässerige Lösung von 23,1 g Bariumacetat. 1 aq. zugegeben und 10 Minuten geschüttelt. Darauf wurden 2250 ccm Äthanol hinzugefügt und der Niederschlag abzentrifugiert. Er wurde in 300 ccm 1-proc. eiskalter Salzsäure gelöst und nach Zugabe von etwas Äthanol bis zum beginnenden Auftreten eines Niederschlages mit Kalilauge genau neutralisiert. Nach dem Abschleudern wurde die Operation wiederholt und das Bariumsalz bei 20° und 15 mm Druck getrocknet. Ausbeute 90—95 Proc.

Methylglycosid des fructose-diphosphorsauren Bariums.

50 g scharf getrocknetes Bariumsalz wurden in 1 Liter 1,688-proc. absolut methanolischer Salzsäure unter Schütteln gelöst und bei 25° stehen gelassen.

Stunden	ccm Probe	mg Cu	mg Fructose	% Fructose
14,5	1	5,92	3,26	6,52
50	3	8,86	4,93	3,29
93	5	2,22	1,21	0,48
97	3	0,74	0,42	0,28
110	5	0,37	0,20	0,08

Nachdem der Red.-W. unter 0,1 Proc. gesunken war, wurde vom ausgeschiedenen Bariumchlorid abfiltriert, der Überschuß an HCl durch Zusatz von Bariumcarbonat gebunden, filtriert und mit methanolischer Barytlösung versetzt, bis eine filtrierte Probe gegen Phenolphtalein schwach alkalisch reagierte. Das ausgeschiedene Methyl-fructosid-diphosphorsaure Barium wurde abzentrifugiert und an der Luft getrocknet. Red.W. 0,1—0,2 Proc. Anorg. Phosphorsäure nach K. Lohmann und L. Tendrasik[1]) 0,15 Proc.

[1]) Bio. Z. 178, 419 (1926).

Vorbereitende Aufteilung des Gemisches der Bariumsalze der beiden Methyl-fructosid-diphosphorsäuren.

Die Aufteilung ließ sich am sichersten in der Weise erreichen, daß aus einer 1-proc. wässerigen Lösung der Salze nahezu die gesamte Substanzmenge ausgefällt, die Mutterlauge eingeengt und so die in ihr enthaltenen Restmengen, welche die negativ drehende Komponente enthielten, gewonnen wurden. Auf diesem Wege konnte das Gemisch in 120 g von + 2,8—4,8° und 113,9 g von — 2,0 bis — 3,6° drehende Bariumsalze zerlegt werden.

Umwandlung in die Brucinsalze und weitere Fraktionierung.

Die vorfraktionierten Bariumsalze wurden mit der äquivalenten Menge eiskalter verdünnter Schwefelsäure zerlegt, vom ausgeschiedenen Bariumsulfat abfiltriert und eine ausreichende Menge Brucinlösung zugegeben. Da die aus den alkoholischen Lösungen auskrystallisierenden Brucinsalze geringe Mengen von Brucin beigemengt enthielten, war es wegen der starken Eigendrehung des Brucins nicht möglich, den Fortschritt der Fraktionierung direkt an der Drehung der Brucinsalze zu verfolgen, es mußten vielmehr zu diesem Zwecke jeweils Proben in die Bariumsalze zurückverwandelt werden.

Die α-Komponente wurde aus 96-proc. Äthanol umkrystallisiert, bis eine Drehung von $(\alpha)_D = +\ 8^0 + 8{,}5^0$ (Wasser, $c = 1$) beim Bariumsalz erreicht war.

Die β-Komponente wurde so lange aus 50-proc. Äthanol umkrystallisiert, bis die Drehung des Bariumsalzes $(\alpha)_D = -\ 8{,}75^0$ (Wasser, $c = 1{,}4$) oder $(\alpha)_{5461} = -\ 10{,}4^0$ (Wasser, $c = 1{,}4$) betrug.

Ba	Ber.	α 43,97	P	9,93	OCH_3	4,96
	Gef.	α 43,6		—		—
	„	β 43,83		9,79		4,78

Dephosphorylierung mit Nierenphosphatase.

Die Phosphatase wurde nach der Vorschrift von H. und E. Albers aus frischen Schweinenieren gewonnen und ihre Aktivität an einer Probe von methyl-fructosid-diphosphorsaurem Barium gemessen. Die Entphosphorylierung wurde durchgeführt indem der p_H-Wert unter Kontrolle durch ein eingeschaltetes Capillarelektrometer durch Barytwasserzusatz auf 9,0 gehalten und der Fortschritt der Abspaltung der Phosphorsäure colorimetrisch nach der Molybdat-Eikonogen-Methode bis zum Stillstand verfolgt wurde. Von den ausgeschiedenen anorganischen Salzen wurde abfiltriert und die Lösung bei 40° unter Zusatz von Natrium-bicarbonat eingedampft, der Rückstand mit Äthanol ausgezogen, der Auszug eingedampft

und der Vorgang wiederholt. Es hinterblieb ein bräunlicher, sehr zäher Sirup. Ausbeute 80—90 Proc.

Acetylierung der Methyl-fructo-furanoside.

5 g β-Methyl-fructo-furanosid, 1,8 g frisch geschmolzenes Natriumacetat und 25 ccm frisch destilliertes Essigsäureanhydrid wurden etwa 100 Minuten auf dem siedenden Wasserbad erhitzt; darauf wird 12 Stunden auf Eis gestellt. Der dann erstarrte Brei wurde mit 200 ccm Eiswasser gemischt und unter Kühlung mit 48,5 g festem Natrium-bicarbonat versetzt, mit Chloroform erschöpfend ausgezogen, der Auszug mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Ausbeute 8,22 g = 88 Proc. Die α-Verbindung wurde ebenso acetyliert.

Die Acetylverbindungen gingen bei 107—112° und 0,0001 mm Druck als farblose Flüssigkeiten über, die auf keine Weise zum Krystallisieren zu bringen waren.

$[\alpha]_D^{18} = -26{,}2^0$ (Methanol, $c = 1$) und $+ 64{,}8^0$ (Methanol, $c = 1$).

Entacetylierung der α- und β-Tetraacetyl-methyl-fructoside.

1 g Tetraacetyl-β-methyl-fructosid wurde in 4 ccm absolutem, über Magnesium destilliertem Methanol gelöst und mit 0,5 ccm $^n/_{10}$-Natriummethylatlösung versetzt. Nach 24-stündigem Stehen bei 20° wurde noch 1 Stunde auf 40° erwärmt. Das Lösungsmittel wurde verjagt, der Rückstand in Wasser aufgenommen. Bei 0° wurde einige Minuten Kohlendioxyd eingeleitet, erneut eingedampft und der Rückstand in absolutem Äthanol aufgenommen. Ausbeute: 0,53 g = 99 Proc. Es wurde in möglichst wenig Methanol gelöst und das Fructosid durch Zusatz der 20—40-fachen Menge Benzol ausgefällt. Diese Operation wurde noch 2-mal wiederholt. Der nach dem Eindampfen und scharfen Trocknen im Hochvakuum verbleibende leicht gefärbte Sirup löste sich praktisch farblos und vollkommen klar in Wasser.

$(\alpha)_D = -49{,}95^0$ (Wasser, $c = 1$); $(\alpha)_{5461} = -58{,}92$ (Wasser, $c = 1$); OCH_3: 15,75 15,86, ber. 15,98. Red.-W. n. Bertrand: 0,12 Proc.

Die analog gewonnene α-Verbindung gab eine leicht getrübte Lösung in Wasser.

$(\alpha)_D = +56{,}9^0$ (Methanol, $c = 1{,}4$).

Invertinspaltung der Methyl-fructoside.

Das Invertin wurde nach der Vorschrift von R. Weidenhagen und L. Schriever[1]) bereitet, sein Zeitwert nach R. Willstätter und W. Steibelt betrug 0,27 Min./g.

179,98 mg β-Methyl-fructo-furanosid wurden mit 2 ccm Acetatpuffer und 0,08 ccm Invertinlösung zu 27 ccm gelöst und bei 30° aufbewahrt. Je 5 ccm wurden titriert.

Stunden	mg Cu	% Fructose	% Spaltung
22	53,1	88,05	94,9
36	53,2	88,2	95,1

169,1 mg α-Methyl-fructo-furanosid wurden mit 2 ccm Pufferlösung und 0,08 ccm Invertinlösung zu 50 ccm aufgelöst und bei 30° aufbewahrt. Je 15 ccm wurden titriert.

Stunden	mg Fructose	% Fructose	% Spaltung
15	9,9	19,75	21,3
24	10,08	20,1	21,65

Ein nach Purves und Hudson hergestelltes krystallisiertes α-Methyl-fructo-furanosid gab wie zu erwarten, unter den gleichen Bedingungen keine Spaltung.

Säurespaltung des β-Methyl-fructo-furanosids.

196,45 mg Substanz wurden zu 10 ccm n-Schwefelsäure gelöst und bei 20,00° aufbewahrt. Je 2 ccm wurden titriert:

Minuten	mg Fructose	% Fructose	% Spaltung
17	7,31	18,62	20,1
40	14,75	37,6	40,5
48	17,21	43,85	47,3
57	19,15	48,80	52,6

Graphisch ermittelte Halbumsatzzeit: 52,5 Minuten. Die vollständige Hydrolyse wurde an je 33,34 mg unter den gleichen Bedingungen gemessen:

Stunden	mg Fructose	% Fructose	% Spaltung
22	29,9	89,7	96,7
36	30,05	90,2	97,2

[1]) Z. d. Ver. dt. Zuckerind. **84**, 402 (1934).

Einwirkung von Invertin auf die Bariumsalze der α- und β-Methyl-fructosid-diphosphorsäuren.

148,1 mg Bariumsalz $(\alpha)_D = +8{,}5^0$, 3 ccm Acetatpuffer, 0,08 ccm Invertinlösung wurden zu 25 ccm gelöst und bei 30° aufbewahrt. Je 10 ccm wurden titriert.

Stunden	mg Cu
1	0,66
17	0,66

159,0 mg Bariumsalz $(\alpha)_D = -8{,}7^0$, 3 ccm Acetatpuffer, 0,08 ccm Invertinlösung wurden zu 25 ccm gelöst und bei 30° aufbewahrt. Je 10 ccm wurden titriert.

Stunden	mg Cu
1	0,66
17	0,60

[Mitteilungen aus dem Chemischen Laboratorium der Bayer. Akademie der Wissenschaften zu München.]

(Eingelaufen am 4. August 1939.)

Der Abbau der Citronensäure durch Bakterien;

von *Michael Deffner* und *Wilhelm Franke*.

Mit 4 Figuren im Text.

In einer vorausgehenden Mitteilung[1]) hat M. Deffner — im Anschluß an eine wohl zuerst von Wieland und Sonderhoff[2]) geäußerte Vermutung — ein Schema für die bakterielle Vergärung der Citronensäure entwickelt, an dessen Spitze der anaerobe Zerfall des Citronensäure-moleküls in Oxalessigsäure + Essigsäure steht:

$$\text{I} \quad \begin{matrix} \text{HOOC.CH}_2\text{.C(OH).CH}_2\text{.COOH} \\ \vdots \\ \text{COOH} \end{matrix} = \text{HOOC.CH}_2\text{.CO.COOH} + \text{CH}_3\text{.COOH}$$

[1]) A. **536**, 44 (1938).

[2]) A. **503**, 61 (1933); Erg. Enzymfschg **3**, 163 (1934).

Zahlreiche Bilanzen der erhaltenen Gärungsprodukte ergaben, daß der weitere Reaktionsverlauf am besten im Sinne der 3 Gleichungen

Ia $HOOC.CH_2.CO.COOH + 4H = HOOC.CH_2.CH_2.COOH + H_2O$

Ib $2HOOC.CH_2.CO.COOH + 2H_2O - 4H = 4CO_2 + 2CH_3.COOH$

Ic $HOOC.CH_2.CO.COOH + H_2O = CO_2 + HCOOH + CH_3.COOH$

zu beschreiben ist, entsprechend der Tatsache, daß aus *4 Molekülen Citronensäure* sehr angenähert *7 Moleküle Essigsäure* (Gleichung I ist für diese Bilanz mit dem Index 4 zu versehen), *5 Moleküle* CO_2, *1 Molekül HCOOH* und *1 Molekül Bernsteinsäure* entstehen.

Diese Befunde, die an einem aus Münchner Löwenbräuhefe isolierten, zunächst nicht näher bestimmten Bakterium erhalten worden waren, standen nun im Widerspruch einerseits zu den älteren Angaben von Butterworth und Walker[1]) über den Citratabbau durch *B. pyocyaneum* (1.), andererseits zu der neueren von Martius[2]) für den Citronensäure-umsatz in *tierischem Gewebe* entwickelten und experimentell belegten Theorie (2.).

1. Nach Walker und Mitarbeitern ist das Primärprodukt des Citratabbaus durch das genannte Bakterium (wie auch durch den Schimmelpilz *Aspergillus niger*[3]) *Acetondicarbonsäure*, die vermutlich nach

II $$\begin{matrix} HOOC.CH_2.C(OH).CH_2.COOH \\ | \\ COOH \end{matrix} = HOOC.CH_2.CO.CH_2.COOH + HCOOH$$

gebildet wird und weiterhin — hauptsächlich wohl über *Malonsäure* — zu *Essigsäure*, teilweise auch zu *Bernsteinsäure* abgebaut wird. Nach Butterworth und Walker sollen sich zu geeigneten Zeitpunkten des Gärungsablaufs *Acetondicarbonsäure* (als Aceton) in einer Ausbeute bis zu 67%, *Malonsäure* in einer solchen von 52% der eingesetzten Citronensäure fassen lassen.

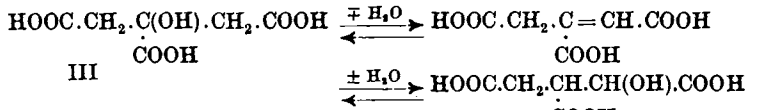
---

[1]) Biochem. J. **23**, 926 (1929).

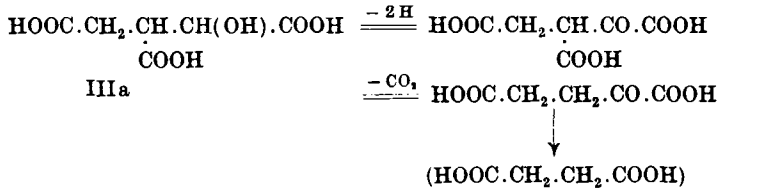
[2]) H. **247**, 104 (1937).

[3]) F. Challenger, Subramaniam u. Walker, Soc. **1927**, 200, 3044.

2. Martius hat für den tierischen Organismus die primäre Umlagerung der Citronensäure (über Aconitsäure) in *Isocitronensäure*



und deren Abbau über Oxalbernsteinsäure zu *α-Ketoglutarsäure* (und eventuell weiterhin zu *Bernsteinsäure*)



bewiesen. Er glaubt neuerdings[1]), gestützt auf das in einigen Bakterien (*B. coli*, *B. prodigiosum*, *B. pyocyaneum*) nachgewiesene Vorkommen des Reaktion III katalysierenden Enzyms *Aconitase*, daß die Abbaufolge bis zur α-Ketoglutarsäure auch für *Mikroorganismen* obligat sei; Reduktion zu *α-Oxyglutarsäure*, Umlagerung der letzteren in *β-Oxyglutarsäure* (analog Reaktion III) und anschließende Dehydrierung zu *Acetondicarbonsäure* (*β-Ketoglutarsäure*) würden die Voraussetzung sowohl für die Entstehung von *Aceton* als auch von *Essigsäure* schaffen, ganz abgesehen von der zwanglosen Erklärung der *Bernsteinsäure*-bildung (im Sinne von Gleichung IIIa).

Hauptzweck der vorliegenden Untersuchung war es, die hier zweifellos noch bestehenden Widersprüche und Unklarheiten zu beseitigen, wozu vor allem eine Nacharbeitung der von Butterworth und Walker an *B. pyocyaneum* erhobenen Befunde notwendig war. Das Gewicht der Martiusschen Einwände und Formulierungen war an Hand der Bilanzen zu prüfen, wobei zu berücksichtigen war, daß das Deffnersche Schema hinsichtlich der Oxydoreduktionsbilanz ausgeglichen ist, während dasjenige von Martius zum wenigsten *eine* über-

[1]) H. **257**, 29 (1938).

zählige Dehydrierungsphase enthält; in diesem Zusammenhang war weiter zu untersuchen, ob unser Schema auch dem *aeroben* Citratabbau durch Bakterien gerecht zu werden vermag. Schließlich waren noch einige Fragen mehr *bakteriologischer* Art zu klären; dazu gehörte die Identifizierung des bisher verwendeten Bakteriums aus Brauereihefe, sowie die Beseitigung einer Diskrepanz zwischen Stoffwechsel- und Dehydrierungsversuch, auf die zuerst Franke und Peris[1]) hingewiesen haben: die Citronensäure, die nach übereinstimmenden Literaturangaben der überwiegenden Mehrzahl der Bakterien als ausgezeichnetes *Baumaterial* zu dienen imstande ist, zeigt in aeroben Dehydrierungsversuchen mit *ruhenden* Bakterien — von wenigen Ausnahmen abgesehen — eine erstaunliche Resistenz.

I. Identifizierung des aus „verarmter" Hefe isolierbaren citratvergärenden Bakteriums.

Die Isolierung dieses Bakteriums, mit dem erstmalig Wieland und Sonderhoff[2]), sowie Sonderhoff und Deffner[3]) über den anaeroben Abbau der Citronensäure und etwas später Wieland, Crawford und Walch[4]) über die Vergärung der Fumar-, Äpfel- und Oxalessigsäure gearbeitet hatten, geschah nach den in den beiden letztgenannten Arbeiten enthaltenen Angaben. Morphologische und chemische Identifizierungsversuche ergaben eindeutig, daß der Mikroorganismus in die *Aerogenes*-gruppe (in der angelsächsischen, holländischen und dänischen Literatur meist als *Aerobacter* bezeichnet) gehört und als *Bact. lactis aerogenes* bzw. *Aerobacter aerogenes* zu klassifizieren ist[5]).

Das Vorkommen von *Milchsäurebakterien* in Hefe ist übrigens bekannt[6]). Bei den folgenden Bestimmungsversuchen dienten uns

[1]) Bio. Z. 295, 61 (1937).
[2]) A. 503, 61 (1933); 520, 150 (1935).
[3]) A. 525, 132 (1936). [4]) A. 525, 119 (1936).
[5]) Zur Nomenklaturfrage vgl. z. B. R. E. Buchanan, General systematic bacteriology, S. 169 (Baltimore 1925).
[6]) Vgl. z. B. A. Janke u. H. Zikes, Arbeitsmethoden der Mikrobiologie, S. 142 (Dresden u. Leipzig 1928).

verschiedene Stämme von *B. lactis aerogenes* wie auch *B. acidi lactici* [das mit ersterem sehr nahe verwandt, wenn nicht identisch ist[1])] zum Vergleich[2]). Bei der Prüfung auf eine bestimmte Eigenschaft wurden stets auch andere Bakterien-spezies [z. B. *B. coli*, *B. prodigiosum*, *B. pyocyaneum*, *B. vulgare* (*Proteus*)] von bestimmt abweichendem Verhalten zur Kontrolle herangezogen.

Zur Charakterisierung der aus Münchener Löwenbräuhefe isolierbaren Aerogenes-Stämme (im folgenden der Einfachheit halber des öfteren als „Hefe-Bakterium" oder „Hefe-Aerogenes" bezeichnet) mögen folgende Angaben dienen:

Es handelt sich um 0,9—1,7 μ lange und 0,4—0,7 μ breite *gramnegative* Stäbchen; je jünger die Kultur, um so kürzer und gedrungener ist im allgemeinen der Habitus, um so größer ist auch, wie schon Wieland u. Mitarbeiter (a. a. O.) feststellten, die Fähigkeit zum anaeroben Substratabbau. *Sporenbildung* und *Eigenbewegung* sind nicht beobachtet worden. Das Wachstum erfolgt *aerob* wie *anaerob*, auf den üblichen *festen* Nährböden in Form saftig glänzender Auflagen. *Gelatine* wird nicht verflüssigt, hingegen *Milch* im Verlauf eines bis mehrerer Tage — je nach Stamm und Alter der Kultur — unter Säuerung koaguliert. Sowohl aus Glucose- wie aus Lactosebouillon wird im Gärröhrchen *Gas* entwickelt, das im ersteren Falle aus etwa gleichen Teilen H_2 und CO_2, im letzteren aus mehr H_2 als CO_2 besteht. In Bouillon-kultur erfolgt deutliche *H_2S-Bildung*, Bebrütung in der Zipfelschen Tryptophan-Lactatnährlösung gibt stark positive *Indol*-reaktionen (und zwar sowohl nach Ehrlich-Frieber wie nach Legal-Weyl und Kitasato-Salkowski[3])]. Zur Differentialdiagnose, insbesondere gegenüber der Coli-gruppe, eignen sich der Voges-Proskauer-, der *Methylrot*- und der *Citrat-test*[4]). Namentlich der stark *positive* Ausfall des ersteren — im Prinzip eine Reaktion auf *Acetoin*, die nach der verbesserten Methode von Werkman[5]) ausgeführt wurde — ist äußerst charakteristisch für die Vertreter der Gattung *Aerogenes*. Dazu paßt, daß auf Glucose-Pepton-Phosphat [nach Koser[4])]

---

[1]) Näheres bei K. B. Lehmann u. R. O. Neumann, Bakteriologische Diagnostik, Bd. II, S. 356 (München 1927).

[2]) Die Stämme waren u. a. vom Hygienischen Institut der hiesigen Universität, von den milchwirtschaftlichen Forschungsinstituten in Weihenstephan und Kiel, von der ehem. Králschen Sammlung in Wien und vom College of agriculture in Berkeley (Cal.) bezogen. Den Herren Professoren Demeter (Weihenstephan), Hettche (München) und Barker (Berkeley) sind wir für die kostenlose Überlassung von *Aerogenes*-kulturen zu großem Dank verpflichtet.

[3]) Zur Methodik vgl. M. Klimmer, Technik und Methodik der Bakteriologie und Serologie, S. 267 (Berlin 1923).

[4]) S. A. Koser, J. Bacteriol. **9**, 59 (1924).

[5]) C. H. Werkman, J. Bacteriol. **20**, 121 (1930).

keine mit Methylrot nachweisbare *Säuerung* erfolgte und daß das Wachstum auf Mineralsalzlösungen, die *Citrat* als einzige C-Quelle enthielten, stets ausgezeichnet war[1]).

II. Der Einfluß der „Gewöhnung" auf den Citratabbau durch Bakterien.

In der schon zitierten Arbeit von Franke und Peris war in 3-stündigen aeroben Versuchen mit ruhenden Bakterien, die durchweg auf Bouillon-Agar gezüchtet worden waren, auch in einigen solchen Fällen kein Angriff der Citronensäure festzustellen gewesen, wo deren Verwertung als C-Quelle des Wachstums aus älteren Untersuchungen[2]) mit Sicherheit bekannt, ihr Abbau teilweise sogar präparativ untersucht worden war (z. B. bei *B. lactis aerogenes*[3]) bzw. *acidi lactici* und *B. pyo-*

[1]) Hingegen wuchs unser Hefe-bakterium im Gegensatz zu verschiedenen anderen geprüften Lactis aerogenes- bzw. Acidi lactici-Stämmen ziemlich schlecht auf *Weinsäure*, ein Befund, dem indes nach Koser [J. Bacteriol. 8, 493 (1923)], der ein recht unterschiedliches Verhalten der genannten Bakteriengruppe gegenüber Tartrat festgestellt hat, keine diagnostische Bedeutung zukommt. Auf diesen Punkt wird hier nur deshalb hingewiesen, weil C. B. van Niel in einem Übersichtsreferat [Ann. Rev. Biochem. 6, 609 (1937)] den von Wieland und seiner Schule verwendeten Mikroorganismus für identisch hält mit einem von Barker [Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam, Proc. 39, Nr. 5 (1936)] aus Gartenerde durch Kultur auf Tartratlösung reingezüchteten Bakterium, das gleichfalls hervorragendes Vermögen zur Vergärung von C_4-Dicarbonsäuren besitzt. Ein derartiger Organismus war früher schon von Nijdam als *Aerobacter tartarivorum* beschrieben worden, Barker hält diese Spezialisierung jedoch für unnötig und rubriziert seinen Organismus schlechthin als *Aerobacter aerogenes*. Die Prüfung einer uns von Prof. Barker in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellten Reinkultur ergab, daß sein Aerogenesstamm sich gegenüber Citronensäure und Weinsäure genau umgekehrt verhält wie unser Hefe-Aerogenes: er wächst nämlich ausgezeichnet auf Tartrat, aber ziemlich dürftig auf Citrat, ein weiterer Beleg für die recht erheblichen Variationen im Bereich der Aerogenes-gruppe, der zugleich die Grenzen einer des öfteren vorgeschlagenen, rein *chemischen* Diagnostik der Mikroorganismen (vgl. z. B. W. Franke u. Peris, a. a. O., S. 88) aufzeigt. *Ein* Hauptgrund derartiger Stammesunterschiede liegt zweifellos in *Gewöhnungserscheinungen*, wofür im folgenden Abschnitt noch experimentelle Belege gebracht werden sollen.

[2]) Vgl. z. B. A. Maassen, Arb. kais. Gesundheitsamt **12**, 340 (1896).

[3]) A. W. Bosworth u. Prucha, J. biol. Chem. **8**, 479 (1911); H. C. Brown, Duncan u. Henry, J. Hygiene **23**, 1 (1924).

cyaneum[1]). Es war seinerzeit — unter Hinweis auf die damals allein bekannten Schemata II und III (S. 86/87) — angenommen worden, „daß eine *nicht*dehydrierende Vorbereitungsreaktion dieser Art in Bakterien im allgemeinen langsam erfolgt, was bei den vielstündigen Stoffwechselversuchen keine erhebliche Rolle spielt, wohl aber bei den relativ kurzdauernden Dehydrierungsversuchen". Wir sind heute der Auffassung, daß diese Primärreaktion, sowohl unter anaeroben wie aeroben Bedingungen, bei Bakterien allgemein durch Gleichung I dargestellt wird, und daß sie durch ein *adaptives* Enzym im Sinne Karströms[2]) (d. h. ein Enzym, das sich — im Gegensatz zu den *konstitutiven* — in den Zellen erst unter dem Einfluß der *Gewöhnung* an das Substrat, hier Citronensäure, bildet) katalysiert wird.

Experimentelle Belege für die Richtigkeit dieser Auffassung ließen sich am Beispiel des *Citrat*abbaus sowohl bei *B. lactis aerogenes* und *B. acidi lactici* wie auch bei *B. pyocyaneum* erbringen. Am erstgenannten Organismus konnte ferner gezeigt werden, daß die Verhältnisse für den Angriff des *Tartrats* (den Franke und Peris unter ihren Bedingungen bei keinem einzigen von 20 untersuchten Bakterien eindeutig hatten nachweisen können) ganz analog liegen.

Die zu diesen Versuchen verwendeten Bakterien wurden auf 2 bzw. 3 verschiedenen Nährböden gezüchtet:

1. auf einem „natürlichen", *Hefewasser*, das durch Auskochen von Preßhefe mit der 10fachen Wassermenge, Filtrieren und Sterilisieren gewonnen worden war;

2. auf einem „künstlichen" *Mineralsalznährboden*, der im Liter 1,5 g NH_4NO_3, 1,5 g KH_2PO_4, 0,1 g KCl, 0,3 g $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$ und Spuren von $FeCl_3$ enthielt; als C-Quelle erhielt

2a) 10 g krystallisiertes *Na_3-Citrat*,

2b) 10 g krystallisiertes *Na_2-Tartrat*.

Die Bebrütung erfolgte in sterilen Erlenmeyer-kolben 20—24 Stunden lang bei 37°. Die Herstellung einer Suspension von ruhenden, verarmten Bakterien bekannten Trockengewichts geschah in der üblichen, u. a. in den öfters zitierten Arbeiten von M. Deffner und W. Franke u. Peris eingehend geschilderten Weise. (Bei manchen Stämmen ließen sich die Organismen infolge ihrer zäh-schleimigen Beschaffenheit kaum aus der

[1]) J. Butterworth u. Walker, a. a. O., S. 86.

[2]) H. Karström, Erg. Enzymfschg 7, 350 (1938).

Nährlösung abzentrifugieren. In solchen Fällen wurden *feste* Nährböden verwendet, die durch Zusatz von 3 Proc. Agar zu den Nährlösungen erhalten worden waren.)

Das Vermögen der Organismen zum Abbau von Citronen- bzw. Weinsäure wurde bei 37° in aeroben Versuchen nach der Barcroft-Warburg-Methodik festgestellt (Gasraum stets *Luft*). Der allgemeine Ansatz war:

2 ccm Bakterien-suspension (7—10 mg Trockengewicht),
1 ccm $^{m}/_{7,5}$-Phosphatpuffer (p_H7),
2 ccm physiologische NaCl-Lösung bzw. $^{m}/_{100}$-Substratlösung.

Ansätze mit Na-Acetat oder Na_2-Succinat als Substrat liefen stets nebenher, um die annähernd gleiche Aktivität der auf verschiedenen Nährböden gewachsenen Bakterien gegenüber diesen offensichtlich durch *konstitutive* Dehydrasen angegriffenen Substraten darzutun.

Das Ergebnis eines Versuchs, in dem *B. lactis aerogenes* (Weihenstephan), das parallel auf Hefewasser, Citrat- und Tartratnährlösung gezüchtet worden war, auf sein aerobes

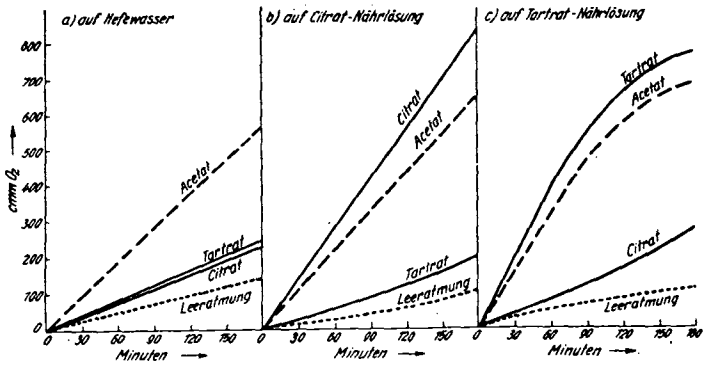


Fig. 1.

B. lactis aerogenes, auf verschiedenen Nährböden gezüchtet.

Dehydrierungsvermögen gegenüber *Essigsäure*, *Citronensäure* und *Weinsäure* geprüft wurde, zeigt Fig. 1. Eindeutig erkennt man in b) und c) die außerordentlich gesteigerte Oxydationsgeschwindigkeit desjenigen Substrats, an das sich der Organismus während der Züchtung hatte gewöhnen können.

Im übrigen bestehen innerhalb der Aerogenes-gruppe, wie orientierende Barcroft-Versuche mit auf Kollektivnährböden (wie Hefewasser,

Nährbouillon) gewachsenen Organismen zeigten, alle Abstufungen hinsichtlich des Citrat- und Tartratangriffs, vom fast völligen Unvermögen bis zu recht ausgesprochener Abbaufähigkeit (vgl. auch Fußnote S. 90). Der seinerzeit von Franke u. Peris verwendete Acidi lactici-Stamm war in dieser Beziehung einer der reaktionsträgsten.

Über die für die Gewöhnung notwendige Zeitspanne läßt sich a priori nichts Bestimmtes aussagen. Während sich in Fig. 1a innerhalb der Versuchsdauer von 3 Stunden keinerlei Hinweis auf beginnende Adaptation, in 1b und 1c bei Tartrat bzw. Citrat nur leichte Andeutungen einer solchen erkennen lassen, trat der Gewöhnungseffekt bei anderen Stämmen in

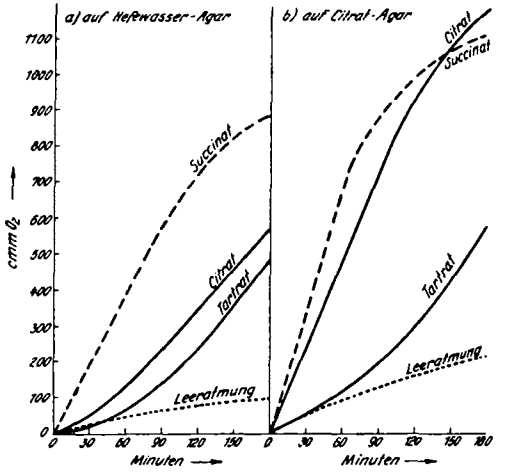


Fig. 2.

B. acidi lactici, auf verschiedenen Nährböden gezüchtet.

der gleichen Zeit schon in recht betonter Weise auf, wie dies in Fig. 2 für einen Stamm von *B. acidi lactici* (Kiel) gezeigt wird.

Der autokatalytische Verlauf des Citrat- und Tartratabbaus in Fig. 2a, des Tartratabbaus in Fig. 2b kann wohl kaum anders gedeutet werden, als daß die betreffenden Substrate als *Reiz auf die Einzelzelle* wirken, die mit vermehrter Enzymbildung, bzw. Freilegung des Enzyms aus einer inaktiven Vorstufe [nach Yudkin[1])] darauf reagiert. Denn die

[1]) Biol. Rev. **13**, 93 (1938).

Kürze der Versuchsdauer und die Tatsache, daß es sich um *ruhende*, d. h. mangels einer N-Quelle sich nicht teilende Bakterien handelt, schließt die beiden anderen Erklärungsmöglichkeiten aus, nämlich daß die Substrate als *Bausteine* bei der Synthese der Enzymmoleküle oder aber als *auswählende Agentien* während der Vermehrung der Zellen, in denen das entsprechende Enzym als Mutation aufgetreten ist, wirken[1]).

Auch bei unseren *Hefe-Aerogenes*-stämmen, sowie bei *B. pyocyaneum* treten die Erscheinungen der Gewöhnung an Citronensäure qualitativ in der gleichen Weise auf, wie aus der folgenden Tabelle — die Züchtungs- und Versuchsbedingungen waren die gleichen wie oben schon beschrieben — eindeutig hervorgeht.

Tabelle 1.

Zeit (Min.)	*B. lactis aerogenes*, gezüchtet auf						*B. pyocyaneum*[2]), gezüchtet auf					
	a) Hefewasser			b) Citratlösung			a) Hefewasser			b) Citratlösung		
cmm O_2	Leer-atmg.	Succi-nat	Ci-trat	Leer-atmg.	Succi-nat	Ci-trat	Leer-atmg.	Ace-tat	Ci-trat	Leer-atmg.	Ace-tat	Ci-trat
60′	55	310	**120**	65	350	**395**	90	520	**150**	70	820	**1140**
120′	120	650	**300**	130	720	**620**	160	1250	**285**	135	1460	**2170**
180′	180	940	**470**	200	960	**800**	230	1560	**470**	190	1730	**2520**

III. Der anaerobe Citratabbau durch B. pyocyaneum.

Die Untersuchung dieses Organismus war für uns insofern von besonderem Interesse, als für ihn als einziges Bakterium die intermediäre Bildung von *Acetondicarbonsäure* bzw. *Aceton* beim Citratabbau (von Butterworth und Walker) angegeben war und experimentell belegt schien. Andere Autoren hatten bei der Citratvergärung durch andere Bakterien, soweit sie auf diese Stoffe prüften, deren Anwesenheit stets vermißt, so H. C. Brown, Duncan und Henry (a. a. O., S. 90) bei *B. suipestifer*, W. F. Bruce[3]) bei dem nahe verwandten *B. aertrycke* und Wieland und Sonderhoff, sowie Deffner bei *B. lactis aerogenes* (aus Hefe).

---

[1]) Vgl. Anmerkung S. 93.

[2]) In den Versuchen mit *B. pyocyaneum* war die Substratkonzentration doppelt so hoch wie in dem S. 92 angegebenen Ansatz.

[3]) J. biol. Chem. **107**, 119 (1934).

Wir haben zunächst die Versuche von Butterworth und Walker mit *wachsenden* Bakterien an zwei verschiedenen Stämmen von *B. pyocyaneum*[1]) nachgearbeitet.

Die Organismen wurden entweder bei 32° oder bei 37° in einer Nährlösung gezüchtet, die auf 1 Liter Leitungswasser 20 g krystallisiertes Diammonium-citrat, 6 g NaCl, 2,5 g KH_2PO_4 und Spuren von $FeCl_3$ enthielt. Nachdem durch NH_3-Zusatz das p_H der Lösung auf 7 eingestellt war, wurden je 200 ccm derselben in 300-ccm-Erlenmeyerkolben sterilisiert, mit einer Öse einer frischen Agarkultur beimpft und bestimmte, aber verschiedene Zeiten im Brutschrank gehalten. Dann wurde je ein Versuch abgebrochen, nach p_H-Kontrolle von den Bakterien abzentrifugiert, angesäuert und die Hälfte des Flüssigkeitsvolumens abdestilliert. Vom Destillat wurde wieder die Hälfte abdestilliert und dieses Verfahren noch einmal wiederholt, so daß schließlich ein Flüssigkeitsvolumen von 20—30 ccm resultierte, das mit 2,4-Dinitrophenyl-hydrazin in 2 n-salzsaurer Lösung versetzt wurde.

Die folgende Tab. 2 enthält eine Zusammenstellung der von uns ausgeführten Versuche zusammen mit einem von Butterworth und Walker angegebenen Versuch, in dem die Menge der zu bestimmten Zeiten gefundenen „Acetonkörper" in Proc. der eingesetzten Citronensäure ausgedrückt sind.

Tabelle 2.

Stämme (Temp.)	Stunden Versuchsdauer (in Klammern End-p_H)								
Stamm 1 (37°)	40 (7,3)						64 (7,6)	112 (8,4)	
Stamm 2 (32°)	40 (7,9)						64 (8,3)	72 (8,6)	
Stamm 2 (37°)	34 (7,6)	41 (7,7)	47 (7,8)	54 (7,9)			63 (8,0)	120 (8,3)	
Stamm v. Butterworth u. Walker (34°)	27	32	40	44	48	55	60	64	72
% Aceton	0,04	0,115	0,20	14,5	16,5	67,0	66,2	0,39	0,115

Das überraschende, aber übereinstimmende Ergebnis aller unserer Versuche war, daß sich *in keinem Falle* mit Sicherheit Aceton nachweisen ließ, obwohl in Kontrollversuchen, in denen kleine Mengen Acetondicarbonsäure (z. B. 10 mg, entsprechend 4 mg Aceton) der oben geschilderten Destillation unterworfen

[1]) Einige *Pyocyaneum*-Stämme verdanken wir dem Entgegenkommen von Herrn Dozenten Dr. habil. G. Endres (Chem. Inst. d. Univ. Hamburg).

wurden, einwandfreie Hydrazonfällungen erhalten wurden. Wir können über die Ursache der Diskrepanz zwischen den Angaben der englischen Autoren und unseren eigenen im Augenblick nichts Bestimmtes aussagen; wir glauben nicht, daß es sich um ein grundsätzlich verschiedenes chemisches Verhalten der verwendeten Pyocyaneum-Stämme handelt, wir neigen vielmehr zu der Annahme, daß den englischen Forschern vielleicht irgendein — nachträglich schwer feststellbarer — methodischer Fehler unterlaufen ist.

Es ist hinsichtlich der quantitativen Verhältnisse zu berücksichtigen, daß jeder unserer Versuchsansätze 3,2 g wasserfreie Citronensäure enthielt; ein selbst nur 1-proc. Umsatz zu Acetondicarbonsäure — rund 10 mg Aceton entsprechend — hätte uns unmöglich entgehen können. Wir erhielten zwar bisweilen im Enddestillat Trübungen und minimale, kaum wägbare oder zu einer Schmelzpunktsbestimmung ausreichende Niederschläge, und zwar besonders dann, wenn wir versuchsweise die Bakterien vor dem Ansäuern und Destillieren nicht durch Zentrifugieren entfernten. (In der Arbeit von Butterworth und Walker findet sich kein Hinweis darauf, daß die Ansätze vor der Aufarbeitung zentrifugiert worden wären; offenbar wurden sie direkt nach dem Ansäuern unter Rückfluß $^1/_4$ Stunde gekocht und anschließend etwa zur Hälfte in eine mit Denigès-Reagens gefüllte Vorlage destilliert.) Jedenfalls konnten diese Trübungen und minimalen Fällungen ebenso gut wie auf Aceton auf *Acetaldehyd* zurückzuführen sein, dessen spurenweise Entstehung (neben etwas größeren Mengen Alkohol) schon von Wieland und Sonderhoff und später von Deffner bei der Citratvergärung durch Hefeaerogenes nachgewiesen worden war.

Die von uns nachgeahmten Versuchsbedingungen von Butterworth u. Walker sind nun insofern nicht einwandfrei, als 1. die Ansätze nicht streng anaerob gehalten werden, durch gelegentliches Umschütteln sogar mit neuem Luftsauerstoff in Berührung kommen; 2. die Nährlösungen bei längerer Versuchsdauer so alkalisch werden (vgl. Tab. 2), daß *B. pyocyaneum* — das nach Dernby[1]) optimal bei p_H 6,8, maximal bei p_H 8,0 wächst — sein Wachstum einstellt und vermutlich geschädigt wird. Dazu

[1]) Ann. Inst. Pasteur **35**, 277 (1921).

kommt 3. der Einwand, der sich allgemein gegen die Methode des „Verwendungsstoffwechsels" erheben läßt, daß nämlich irgendwelche faßbaren Abbauprodukte nicht *direkt* aus der zugesetzten C-Quelle, sondern *indirekt* aus primär daraus aufgebauten Zellsubstanzen (z. B. Aminosäuren) entstanden sein können.

Um bei den folgenden Bilanzversuchen, in denen eine quantitative Ermittlung der bei der Citratvergärung durch *B. pyocyaneum* tatsächlich entstehenden Produkte geplant war, eindeutige Verhältnisse zu haben, wurde wiederum, wie schon in der ersten Arbeit von Deffner, mit *ruhenden Bakterien* und *im Vakuum* bei 37° gearbeitet.

Die Züchtung der hierbei zur Verwendung gelangenden Organismen geschah in einer stärker gepufferten Nährlösung, die im Liter 15 g krystallisiertes Na_3-Citrat, 2 g NH_4NO_3, 4 g KH_2PO_4, 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$, 0,1 g KCl nebst einer Spur $FeCl_3$ enthielt. Bisweilen wurde unter Durchleiten von Stickstoff streng anaerob gezüchtet; doch stieg auch ohne diese Maßnahme das p_H der Nährlösung nur mäßig, beispielsweise in 34 Stunden bei 37° von 6,6 auf 7,4. Einen wesentlichen Unterschied im Verhalten der mit und ohne Stickstoff-durchleitung gezüchteten Bakterien haben wir nie bemerkt.

Nachstehend teilen wir tabellarisch das Resultat dreier mit zwei verschiedenen *Pyocyaneum*-Stämmen ausgeführter *Citronensäure*-versuche, sowie eines *Oxalessigsäure*-versuches mit. Bezüglich methodischer Einzelheiten sei auf die früher zitierten Veröffentlichungen von Wieland und Sonderhoff und von Deffner verwiesen. In Anlehnung an das Verfahren der Kluyverschen Schule[1]) geben wir in den Tabellen außer den *Umsätzen* (in Mmol) auch *C- und H-Bilanzen* (in Proc.) wieder. Sie vermitteln ein zuverlässiges Bild davon, bis zu welchem Umfang das verschwundene Substrat in den Produkten wiedergefunden wird und stellen in ihrer Kombination ein sicheres Kriterium für streng anaerobe Versuchsführung dar.

Zwei *Zahlenbeispiele* mögen die Art ihrer Berechnung veranschaulichen. 1. Bei einem Versuch werden pro Mmol verschwundener Citronensäure 1,8 Mmol Essigsäure gefunden; diese repräsentieren dann $1{,}8 \cdot 2/6 \cdot 100 = 60$ Proc. des ursprünglichen Citronensäure-kohlenstoffs, da Essigsäure 2, Citronensäure 6 C-Atome im Molekül enthält. 2. Unter „H-Kapazität" einer organischen Verbindung werde diejenige Zahl von H-Atomen

[1]) Vgl. z. B. A. J. Kluyver, The chemical activities of microorganisms (London 1931); ferner H. A. Barker, a. a. O., Fußnote S. 90.

verstanden, die frei werden, wenn der gesamte C des Moleküls — allenfalls unter Zuhilfenahme von H_2O — in CO_2 übergeführt wird. Sie ist z. B. für HCOOH = 2, für CH_3COOH = 8 (nach $CH_3.COOH + 2H_2O = 2CO_2 + 8H$), für Oxalessigsäure = 10, für Bernsteinsäure = 14, für Citronensäure = 18. Die 1,8 Mmol Essigsäure des Beispiels 1 stellen demgemäß $1{,}8 \cdot 8/18 \cdot 100 = 80$ Proc. der „H-Kapazität" der abgebauten Citronensäure — in den Tabellen einfach als Proc. H bezeichnet — dar.

Tabelle 3.

Ansatz: 3 Mmol *Na_3-Citrat* in 250 ccm $^m/_{12,5}$-Phosphatpuffer (p_H 6,6); 45 mg (Trockengewicht) Bakterien, anaerob gezüchtet (Stamm 1 München). *Versuchsdauer*: 80 Stunden.

	Umsatz in Mmol	Umsatz in Mmol pro Mmol Citrat	% C	% H
Verschwunden:				
Citronensäure	3	1	100	100
Erhalten:				
CO_2	4,5	1,5	25	0
HCOOH . . .	1,0	0,33	5,5	3,7
$CH_3.COOH$ . .	5,2	1,73	57,8	77,1
$(CH_2.COOH)_2$.	0,51	0,17	11,3	13,2
			total: 99,6	94,0

$$\frac{\%\ H}{\%\ C} = 0{,}94$$

Tabelle 4.

Ansatz: 3 Mmol *Na_3-Citrat* in 250 ccm $^m/_{20}$-Phosphatpuffer (p_H 7,1); 150 mg Bakterien, anaerob gezüchtet (Stamm 1 München). *Versuchsdauer*: 22 Stunden.

	Umsatz in Mmol	Umsatz in Mmol pro Mmol Citrat	% C	% H
Verschwunden:				
Citronensäure	2,5	1	100	100
Erhalten:				
CO_2	3,1	1,24	20,7	0
HCOOH . . .	1,0	0,4	6,7	4,5
$CH_3.COOH$ . .	4,0	1,6	53,4	71,2
$(CH_2.COOH)_2$.	0,38	0,15	10,0	11,7
			total: 90,8	87,4

$$\frac{\%\ H}{\%\ C} = 0{,}96$$

Tabelle 5.

Ansatz: 3,1 Mmol *Na_3-Citrat* in 250 ccm $^m/_{15}$-Phosphatpuffer (p_H = 6,8); 140 mg Bakterien, normal (ohne N_2) gezüchtet (Stamm 2 Hamburg). *Versuchsdauer*: 42 Stunden.

	Umsatz in Mmol	Umsatz in Mmol pro Mmol Citrat	% C	% H
Verschwunden:				
Citronensäure	3,1	1	100	100
Erhalten:				
CO_2	3,76	**1,21**	20,2	0
HCOOH . . .	1,7	**0,55**	9,2	6,1
CH_3.COOH . .	5,4	**1,74**	58,1	77,3
$(CH_2.COOH)_2$.	0,51	**0,165**	11,0	12,8
			total: 98,5	96,2

$$\frac{\%\ H}{\%\ C} = 0{,}98$$

Tabelle 6.

Ansatz: 3 Mmol *Na_2-Oxalacetat* in 250 ccm $^m/_{15}$-Phosphatpuffer (p_H = 6,8); 75 mg Bakterien, normal gezüchtet (Stamm 2 Hamburg). *Versuchsdauer*: 42 Stunden.

	Umsatz in Mmol	Umsatz in Mmol pro Mmol Oxalacetat	% C	% H
Verschwunden:				
Oxalessigsäure	3	1	100	100
Erhalten:				
CO_2	3,66	**1,22**	30,5	0
HCOOH . . .	1,58	**0,53**	13,3	10,6
CH_3.COOH . .	1,98	**0,66**	33,0	52,8
$(CH_2.COOH)_2$.	0,48	**0,16**	16,5	22,4
			total: 93,3	85,8

$$\frac{\%\ H}{\%\ C} = 0{,}92$$

Das Hauptergebnis der in Tab. 3—6 niedergelegten Versuche ist, daß sich die vergorene Citronensäure bzw. Oxalessigsäure bei *B. pyocyaneum* ebenso wie früher bei *B. lactis aerogenes fast vollständig* in den Produkten *CO_2*, *Ameisensäure*, *Essigsäure* und *Bernsteinsäure* wiederfindet; sogar in *quantitativer* Hinsicht bestehen keine grundsätzlichen Abweichungen

zwischen den beiden Organismen, wie aus folgender Gegenüberstellung unserer neuen und der früheren Resultate Deffners (sämtliche Werte in Mmol) hervorgeht:

Tabelle 7.

Pro Mmol Substrat	CO_2	HCOOH	$CH_3.COOH$	$\frac{CH_2.COOH}{CH_2.COOH}$
a) *Citronensäure*				
B. lactis aerogenes	1,1 —1,35	0,23—0,38	1,68—1,86	0,10—0,24
B. pyocyaneum . .	1,21—1,50	0,33—0,55	1,60—1,74	0.15—0,17
b) *Oxalessigsäure*				
B. lactis aerogenes	1,20—1,30	0,34—0,43	0,46—0,68	0,17—0,23
B. pyocyaneum . .	1,22	0,53	0,66	0,16

Besonders wichtig erscheint uns wieder der Vergleich der Parallelversuche mit Citronensäure und Oxalessigsäure: wie die (fettgedruckten) Zahlen in Tab. 5 und 6 erkennen lassen, ergibt sich als einziger Unterschied der Bilanzen der, daß aus Citronensäure rund *1 Mmol Essigsäure mehr* erhalten wird als aus Oxalessigsäure. Dieser — gleichfalls schon bei Hefe-*Aerogenes* beobachtete — Tatbestand scheint uns zusammen mit den gut stimmenden Kohlenstoff- und Oxydoreduktionsbilanzen der Tab. 3—6 die wichtigste Stütze unseres zu Eingang dieser Arbeit entwickelten Abbauschemas zu sein; weder die Vorstellungen von Butterworth und Walker noch diejenigen von Martius vermögen — wie im Abschnitt V noch näher dargetan werden wird — den beobachteten *quantitativen* Verhältnissen gerecht zu werden, ganz abgesehen davon, daß das tatsächliche Verhalten der Bakterien gegenüber den „Schlüsselsubstanzen" dieser Theorien deren intermediäre Entstehung beim Citratabbau so gut wie ausschließt.

Im einzelnen ist zu den Versuchen der Tab. 3—6 noch folgendes zu bemerken:

Die *C-Bilanzen* der Ansätze 3 und 5 stimmen ausgezeichnet, die der Ansätze 4 und 6 weniger gut. Im Fall der *Oxalessigsäure* ist dies — in Anbetracht der Unbeständigkeit des Substrats — verständlich; hier ist insbesondere an die Entstehung

von *Brenztraubensäure* zu denken, die — wie schon Wieland, Crawford und Walch (a. a. O., S. 88) gefunden haben — unter der Einwirkung der Bakterien in zum Teil nicht definierte Sekundärprodukte übergeht. Versuch 4 andererseits ist der einzige, bei dem die eingesetzte Citronensäure in der Versuchszeit nicht vollständig umgesetzt worden ist. Ganz abgesehen davon, daß ein Fehler in der Citronensäure-bestimmung die gesamten Werte der Reaktionsprodukte in der gleichen Richtung und im gleichen Ausmaß zu fälschen vermag, ist gerade bei diesem noch „unfertigen" Versuch damit zu rechnen, daß Zwischenprodukte (wie z. B. Äpfelsäure, Fumarsäure, Brenztraubensäure u. dgl.) im Ansatz vorhanden waren, die sich bei der schematischen Aufarbeitung der Bestimmung entzogen.

Die *H-Bilanzen* liegen, wie sich aus den stets angegebenen Quotienten Proc. H/Proc. C ersehen läßt, durchweg einige Proc. unter den C-Werten. Dies ist erklärlich, da wir gewisse, in kleiner Menge entstandene Produkte relativ hoher „H-Kapazität", wie Alkohol, Milchsäure (eventuell auch mol. H_2) nicht quantitativ bestimmt haben. Wären beispielsweise, wie dies Deffner früher bei einem vollständigen Bilanzversuch an *Aerogenes* gefunden hatte, pro Mmol Citronensäure noch 0,09 Mmol H_2 und 0,043 Mmol C_2H_5OH entstanden, so würde sich hierdurch die C-Bilanz um 1,4 Proc., die H-Bilanz indes um 3,9 Proc. erhöhen.

Im Hinblick auf die kleineren Unterschiede im relativen Anteil der einzelnen Reaktionsprodukte, die sowohl bei verschiedenen *Stämmen* der gleichen Art (Tab. 3—6) — eventuell verstärkt durch Variation der Versuchsbedingungen —, als auch bei verschiedenen *Spezies* (Tab. 7) auftreten, scheint uns folgender Hinweis nicht überflüssig: in unserem Schema sind lediglich die *oxydoreduktiven* Teilreaktionen Ia und Ib (S. 86) zwangsläufig miteinander gekoppelt, der Anteil dieser oxydoreduktiven Phase und der *„hydroklastischen"* Reaktion Ic am Gesamtumsatz der nach I entstandenen Oxalessigsäure kann indes — stöchiometrisch, doch wohl nicht energetisch — in weiten Grenzen variieren und er tut es auch nach unseren Versuchsergebnissen, wenngleich in bescheidenem Ausmaß.

In der nachstehenden Tab. 8 sind in der ersten Spalte einige Kombinationsmöglichkeiten der Gleichungen I—Ic gegeben und in den folgenden Spalten die sich hieraus für den Umsatz eines Mols Citronensäure ergebenden Molzahlen der Reaktionsprodukte.

Tabelle 8.

Pro Mol Citronensäure	CO_2	HCOOH	$CH_3.COOH$	$\frac{CH_2.COOH}{CH_2.COOH}$
A) 4.I + 1.Ia + 2.Ib + 1.Ic	1,25	0,25	1,75	0,25
B) 5.I + 1.Ia + 2.Ib + 2.Ic	1,20	0,40	1,80	0,20
C) 6.I + 1.Ia + 2.Ib + 3.Ic	1,17	0,50	1,84	0,167

Man erkennt so z. B. beim Vergleich mit Tab. 5, daß der dort wiedergegebene Versuch sich am besten mit Schema C der Tab. 8 in Einklang bringen läßt, während ein Versuch aus der früheren Arbeit Deffners mit *B. aerogenes*, bei dem 1,09 Mmol CO_2, 0,23 Mmol HCOOH, 1,68 Mmol $CH_3.COOH$ und 0,24 Mmol $(CH_2\ COOH)_2$ erhalten worden waren, sich zwanglos Schema A fügt.

Fast regelmäßig zu tief, und zwar in dieser wie in der vorausgegangenen Untersuchung, fallen die *Bernsteinsäure*-werte aus. Zweifellos hängt dies mit der Reinigungsmethode, bei der $KMnO_4$ in saurer Lösung und in der Hitze zur Anwendung kommt, zusammen. Im besonderen ist dabei zu bedenken, daß die Hydrierungsreaktion Ia sich in 2 Stufen vollzieht, wobei primär Äpfel- bzw. Fumarsäure entstehen. Kleinere Mengen dieser Säuren, die auf dem Reduktionsweg liegen geblieben sein können, werden durch die Permanganatbehandlung zerstört und entgehen so der Bilanz.

IV. Weitere Angaben über den Citratabbau durch Bakterien.

Da uns aus äußeren Gründen keine Zeit mehr zur experimentellen Untersuchung weiterer Bakterien zur Verfügung stand, haben wir die Ergebnisse anderer Autoren zur Prüfung des Gültigkeitsbereichs unseres Abbauschemas herangezogen[1]).

[1]) Zusammenstellung älterer Arbeiten bei K. Bernhauer, Die oxydativen Gärungen, S. 103f. (Berlin 1932).

Da es sich hierbei zum Teil um ältere, durchweg mit proliferierenden Organismen und meist nicht unter streng anaeroben Bedingungen ausgeführte Versuche handelt, darf an das Material von vorne herein kein allzu strenger Maßstab angelegt werden. Im allgemeinen ist auch nur das eine oder andere Reaktionsprodukt quantitativ bestimmt worden, lediglich von Bruce[1]) sind bei *B. suipestifer* vollständige Bilanzen aufgestellt worden. Wir geben nachstehend die bei den einzelnen Arten gewonnenen Resultate.

B. lactis aerogenes [A. W. Bosworth u. Prucha[2]) 1911]: Pro Mol vergorener Citronensäure werden in 2 Parallelversuchen 1,85 und 2,0 Mol flüchtiger Säure erhalten, die auf Grund qualitativ nachgewiesener d-Toluididbildung als *Essigsäure* angesprochen wird, in Wirklichkeit jedoch aus Essigsäure + Ameisensäure bestand. Nach Tab. 8 lassen sich für $CH_3.COOH + HCOOH$ Werte zwischen 2,0 und 2,35 erwarten.

B. coli commune [E. C. Grey[3]) 1924]: Der Autor läßt die Bakterien auf die Citronensäure in Gegenwart von Ca-Formiat einwirken, wodurch wohl ziemlich zuverlässig anaerobe Verhältnisse gewährleistet waren. Bestimmt wurden CO_2, Essigsäure und Bernsteinsäure. Der CO_2-Wert ist unter den angegebenen Bedingungen nicht brauchbar, an *Essigsäure* werden 1,83, an *Bernsteinsäure* 0,14 Mol pro Mol abgebauter Citronensäure gefunden, was mit Schema C, Tab. 8, gut zu vereinbaren ist.

B. suipestifer [H. C. Brown, Duncan u. Henry[4]) 1924]: Die Menge flüchtiger Säure liegt zwischen 1,7 und 2,1 Mol pro Mol Citronensäure. Sie wird auf Grund einer Ag-Salzfällung wiederum als *Essigsäure* angesprochen, doch gilt auch hier das oben schon bei *B. lactis aerogenes* Gesagte.

B. aertrycke [W. F. Bruce[1]) 1934]: Wir haben die in der Arbeit mitgeteilten Versuche durch Vergleich der C- und der H-Bilanzen kritisch gesichtet. *Versuch 1*, bei dem nur HCOOH (0,25 Mol), $CH_3.COOH$ (1,5 Mol) und $(CH_2.COOH)_2$ (0,75 Mol, alle Zahlen auf 1 Mol abgebauten Citrats umgerechnet) bestimmt wurden, ist ersichtlich — und zwar infolge des viel zu hohen Bernsteinsäure-wertes — falsch, da bei der C-Bilanz schon ohne den CO_2-Wert 104,2 Proc., bei der H-Bilanz gar 128,1 Proc. erreicht werden. Auch *Versuch 2*, bei dem alle Produkte bestimmt wurden, ist für unsere Zwecke unbrauchbar, da bei der Bilanzaufstellung zwar 94,2 Proc. C, aber nur 71,6 Proc. H resultieren. An den Mengen der pro Mol abgebauter Citronensäure erhaltenen Reaktionsprodukte [2,37 Mol CO_2, 0,14 Mol HCOOH, 0,92 Mol $CH_3.COOH$, 0,31 Mol

[1]) J. biol. Chem. **107**, 119 (1934).
[2]) J. biol. Chem. **8**, 479 (1911).
[3]) Proc. Roy. Soc. (B) **96**, 156 (1924).
[4]) J. Hygiene **23**, 1 (1924).

$(CH_2.COOH)_2$] fällt auf, daß der CO_2- und der Bernsteinsäure-wert abnorm hoch, der Ameisensäure- und Essigsäure-wert ungewöhnlich tief liegen. Diese Feststellung zusammen mit der Inkongruenz von C- und H-Bilanz läßt den fast sicheren Schluß zu, daß in diesem Falle nicht streng anaerob gearbeitet wurde, wodurch ein Teil der Ameisensäure zu CO_2, ein Teil der Essigsäure wohl zu Bernsteinsäure oxydiert worden ist. *Versuch 3* endlich mit 91,5 Proc. C und 88,1 Proc. H ist bilanzmäßig ziemlich befriedigend. Pro Mol vergorener Citronensäure — der geringe Citratverlust durch Zellsynthese ist hier wie im Versuch 2 schon abgezogen — werden erhalten (in Mol)

CO_2	HCOOH	$CH_3.COOH$	$(CH_2.COOH)_2$	$CH_3.CHOH.COOH$
1,36	0,39	1,47	0,13	0,01

Vergleicht man diese Zahlen — unter Berücksichtigung des Umstandes, daß sie wegen der nur auf rund 90 Proc. aufgehenden Bilanzen durchweg zu tief liegen dürften — mit denen der Tab. 7, so sieht man, daß sie im allgemeinen innerhalb der Streuungsbreite der von uns für zwei ganz verschiedene Mikroorganismen festgestellten Werte liegen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die in der Literatur vorhandenen quantitativen Angaben über Produkte der bakteriellen Citratvergärung, soweit sie einer kritischen Betrachtung standhalten, in keinem Falle unserem Schema widersprechen, dieses vielmehr, wie besonders in dem allein eingehender untersuchten Beispiel des *B. aertrycke*, wesentlich stützen. Da dieses Abbauschema nunmehr sowohl für Vertreter der *Coli-Aerogenes*-gruppe als auch der Genera *Pseudomonas* und *Salmonella* seine Bestätigung gefunden hat, sind wir geneigt, seine *allgemeine* Gültigkeit für den Citratumsatz durch Bakterien anzunehmen.

V. Andere Theorien des biologischen Citronensäureabbaus und ihre Nachprüfung an Bakterien.

Die *Zucker*vergärung beginnt bekanntlich mit einer *Spaltungsreaktion*, die als Umkehrung einer Aldolkondensation aufzufassen ist und durch ein reversibel wirkendes Enzym *Aldolase*[1]) katalysiert wird. Erst durch sie werden Substrate geschaffen, an denen das für die verschiedenen Gärungsformen charakteristische Spiel der *Oxydoreduktionen* einsetzen kann. Auch die Vergärung der *Citronensäure*, deren Molekül keine

[1]) O. Meyerhof, Lohmann u. Schuster, Bio. Z. **286**, 301, 336 (1936).

erkennbare Möglichkeit zu einer intramolekularen Disproportionierung besitzt, beginnt nach unserer Auffassung mit einer derartigen „Desaldolisierung", für die wohl ein der Meyerhofschen Aldolase verwandtes Enzym verantwortlich zu machen ist. Vom gleichen Reaktionstyp wie die Spaltung in Oxalessigsäure + Essigsäure ist aber im Prinzip auch die Spaltung in Acetondicarbonsäure + Ameisensäure, die zuerst Walker (a. a. O., S. 86) für den Citratabbau durch Mikroben angenommen hat und die Wieland und Sonderhoff (a. a. O., S. 88) später eingehend diskutiert haben.

Von anderer Art ist das Abbauschema, das Martius für tierisches Gewebe entwickelt und bewiesen hat und das er neuerdings auch auf die bakterielle Citratvergärung zu übertragen sucht (a. a. O., S. 87). Hier steht, nachdem der primäre Isomerisierungsprozeß zu Isocitronensäure einmal abgelaufen ist, am Beginn des eigentlichen Abbaus eine eindeutige *Dehydrierungsreaktion*, deren Forderung nach einem *Acceptor* mit den streng anaeroben Bedingungen unserer Versuche von vorne herein in Widerspruch steht. Soweit wir übersehen können, bestehen *prinzipiell* nur zwei Möglichkeiten zur Behebung dieses Widerspruchs. Davon läßt sich die eine, daß nämlich *zelleigene* Acceptoren der Bakterien den gelockerten Wasserstoff der Isocitronensäure quantitativ aufnehmen würden, auf Grund einer einfachen Überlegung ausschalten.

Im Versuch der Tab. 3 (S. 98) setzen z. B. 45 mg Bakterien (Trockengewicht) 3 Mmol Citronensäure um. In diesen 45 mg ist etwa die Hälfte Kohlenstoff, was rund *2 Milli-atom C* entspricht. Ihnen steht ein H-Angebot bei der primären Substratdehydrierung von *6 Milli-atom H* gegenüber. Die außerordentlich konstante Zusammensetzung der lebenden Substanz schließt eine „Zellhydrierung" in dem hier in Frage kommenden Ausmaß vollkommen aus. Ganz abgesehen davon würde das Verschwinden zweier H-Atome in unseren H-Bilanzen ein Defizit von über 10 Proc. bedingen.

Zum wenigsten *diskutierbar* ist die zweite Möglichkeit, daß in einer *Angärungsphase* zwar Zellacceptoren einspringen, daß aber im *stationären Zustand* die beiden H-Atome der Isocitronensäure das bei der Decarboxylierung der Oxalbernsteinsäure entstehende CO_2 (vgl. Gleichung IIIa, S. 87) zu *Ameisensäure* hydrieren, nach der summarischen Gleichung IV

$$\underset{\text{IV}}{\underset{\cdot}{\text{HOOC.CH}_2\text{.C(OH).CH}_2\text{.COOH}}} = \underset{\cdot}{\text{HOOC.CH}_2\text{.CH}}\text{·CHOH.COOH}$$
$$\text{COOH} \qquad\qquad\qquad \text{COOH}$$
$$= \text{HOOC.CH}_2\text{.CH}_2\text{.CO.COOH} + \text{HCOOH}$$

Aber auch hier ergeben sich zwangsweise Einschränkungen. Zunächst ist die Fähigkeit zur HCOOH-Spaltung und zu ihrer Umkehrung, der CO_2-Hydrierung, keineswegs *generell* bei Bakterien vorhanden[1]). (Nachgewiesen ist sie z. B. bei der *Coli-Aerogenes-*, der *Salmonella-* und der *Proteus*-gruppe; beim Genus *Pseudomonas*, als dessen Vertreter wir *B. pyocyaneum* untersucht haben, scheint sie zu fehlen.) Dann aber bestehen gewisse Bedenken energetischer Natur. Die Dehydrierung einer CHOH-Gruppe zur CO-Gruppe erfordert nach den bisher vorliegenden Daten einen Aufwand an freier Energie, der zwischen 6,4 und 11,6 kcal/Mol liegt[2]). Die Reaktion $H_2 + HCO_3^- = HCOO^- + H_2O$ ist energetisch nahezu neutral[1,3]). Bezogen auf „Normalzustände" der Reaktionsteilnehmer[4]) liegt also das Gleichgewicht des Vorgangs

$$\underset{\text{IVa}}{\underset{\cdot}{{}^-\text{OOC.CH}_2\text{.CH.CH(OH).COO}^-}} + \text{HCO}_3^-$$
$$\text{COO}^-$$
$$\rightleftharpoons \underset{\cdot}{{}^-\text{OOC.CH}_2\text{.CH.CO.COO}^-} + \text{HCOO}^- + \text{H}_2\text{O}$$
$$\text{COO}^-$$

theoretisch sehr stark nach links verschoben. *Praktisch* könnten aber zwei Umstände doch einen erheblichen Umsatz in der Richtung von links nach rechts zulassen. Einmal könnte durch energetische Kopplung die freie Energie der Oxalbernsteinsäure-Spaltung

$$\underset{\text{IVb}}{\underset{\cdot}{{}^-\text{OOC.CH}_2\text{.CH.CO.COO}^-}} + \text{H}_2\text{O}$$
$$\text{COO}^-$$
$$= {}^-\text{OOC.CH}_2\text{.CH}_2\text{.CO.COO}^- + \text{HCO}_3^-,$$

die etwa 6 kcal/Mol betragen dürfte[5]), der Dehydrierungsreaktion IVa zugute kommen; andererseits könnte — und dieser Umstand ist wohl wichtiger — durch die notorisch rasch verlaufende Zersetzung der Oxal-

---

[1]) M. Stephenson, Erg. Enzymfschg. 6, 139 (1937).

[2]) Berechnet nach der Potentialzusammenstellung von F. G. Fischer, Erg. Enzymfschg. 8, 185 (1939).

[3]) D. D. Woods, Biochem. J. 30, 515 (1936).

[4]) Vgl. hierzu z. B. P. W. Wilson u. Peterson, Chem. Rev. 8, 427 (1927); E. I. Fulmer, Erg. Enzymfschg. 1, 1 (1932).

[5]) Für die analoge Spaltung der *Brenztraubensäure* unter physiologischen p_H-Bedingungen berechnet sich aus den freien Bildungsenergien der Reaktionsteilnehmer ein Wert von 5,6 kcal/Mol. Die älteren, von Franke [Bio. Z. 258, 280 (1933) und Tab. biol. period. 5, 120 (1935)] geschätzten bzw. berechneten Werte 10 bzw. 14—15 kcal bezogen sich auf die *freie Säure*, nicht das *Anion*.

bernsteinsäure (nach IVb) deren Konzentration im Reaktionssystem IVa dauernd so niedrig gehalten werden, daß nach dem Massenwirkungsgesetz eine starke Gleichgewichtsverlagerung in IVa von links nach rechts erfolgt.

Liegt also die anaerobe Entstehung von Ameisensäure + α-Ketoglutarsäure — wenigstens für gewisse Mikroorganismen — durchaus im Bereich der Möglichkeit, so erhebt sich nunmehr die Frage, ob der sekundäre Abbau der letzteren mit den von uns in den beiden vorausgegangenen Abschnitten aufgezeigten quantitativen Verhältnissen bei der Citratvergärung in Einklang gebracht werden kann.

Bei der versuchsweisen Aufstellung theoretischer Bilanzen — ähnlich denen der Tab. 8 — halten wir uns an die schon in der Einleitung erwähnten Grundvorstellungen von Martius, wonach die *Bernsteinsäure* stets direkt aus α-Ketoglutarsäure, die annähernd 2 Moleküle *Essigsäure* (und eventuell *Aceton*, worauf jedoch nach den Ergebnissen des Abschnitts III nicht mehr näher eingegangen werden soll) nach einem — in enzymatischer Beziehung allerdings teilweise hypothetischen — stufenweisen Umbau zu β-Keto-glutarsäure (= Acetondicarbonsäure) gebildet werden (vgl. S. 87).

Eine sich an IVb anschließende Spaltung der α-Ketoglutarsäure in HCOOH + Bernsteinsäure (IVc)

$$\text{IVc} \qquad \begin{aligned} &\text{HOOC.CH}_2\text{.CH}_2\text{.CO.COOH} + \text{H}_2\text{O} \\ &= \text{HOOC.CH}_2\text{.CH}_2\text{.COOH} + \text{HCOOH} \end{aligned}$$

bietet nach dem bekannten Verhalten von Bakterien gegenüber anderen Ketosäuren[1]) dem Verständnis keine Schwierigkeit.

Andererseits kann die Acetondicarbonsäure nur nach der ad hoc angenommenen Reaktion IVd

$$\text{IVd} \qquad \text{HOOC.CH}_2\text{.CO.CH}_2\text{.COOH} + \text{H}_2\text{O} = 2\,\text{CH}_3\text{.COOH} + \text{CO}_2$$

2 Moleküle *Essigsäure* liefern.

Ähnlich wie dies früher (S. 101 und Tab. 8) bei der Diskussion des Deffnerschen Schemas für den sekundären Abbau der *Oxalessigsäure* geschehen ist, kann im vorliegenden Falle der Umsatz der „Schlüsselsubstanz" *Ketoglutarsäure* zu Bernsteinsäure + HCOOH (nach IVc) mit beliebigen Vielfachen der zu Essigsäure + CO_2 führenden Reaktion IVd kombiniert werden. Dies ist in zahlenmäßiger Analogie zu Tab. 8 in der folgenden Tab. 9 geschehen, wo wiederum die Molzahlen der Produkte pro Mol vergorener Citronensäure angegeben sind.

---

[1]) Vgl. z. B. C. Neuberg u. Mitarbeiter, Bio. Z. **67**, 90 (1914); **71**, 122 (1915); ferner H. Wieland, Crawford u. Walch, a. a. O., S. 88.

Tabelle 9.

Pro Mol Citronensäure	CO_2	HCOOH	$CH_3.COOH$	$\frac{CH_2.COOH}{CH_2.COOH}$
A) 4.IV + 1.IVc + 3.IVd	0,75	1,25	1,50	0,25
B) 5.IV + 1.IVc + 4.IVd	0,80	1,20	1,60	0,20
C) 6.IV + 1.IVc + 5.IVd	0,83	1,17	1,67	0,167

Der Vergleich der obenstehenden theoretischen Zahlenwerte mit den beim bakteriellen Citratabbau tatsächlich gefundenen (Tab. 3—7) beweist eindeutig, daß die — soweit wir sehen können — einzig mögliche streng anaerobe Abbaufolge im Sinne von Martius den experimentellen Tatsachen nicht gerecht wird. Die HCOOH-Werte der Tab. 9 liegen viel höher, die CO_2-Werte viel tiefer als im Experiment; die $CH_3.COOH$-Werte liegen ebenfalls zu tief, doch teilweise nahe an der Fehlergrenze. Vollends hat das Schema von Martius keine plausible Erklärung für die nunmehr an zwei ganz verschiedenen Bakterienspezies experimentell belegte weitgehende Analogie im Abbau von Oxalessigsäure und Citronensäure.

Die anderen von Martius in Betracht gezogenen Deutungsmöglichkeiten für die Entstehung von Essigsäure und Aceton kommen für unsere Versuchsbedingungen und die von uns verwendeten Organismen nicht in Frage. Dies gilt beispielsweise für die Annahme einer intermediären Synthese von *Glutaminsäure* aus α-Ketoglutarsäure + NH_3, an die sich, wie Neuberg[1]) schon 1908 bei Fäulnisvorgängen nachgewiesen hat, Abbau zu *Buttersäure* anschließen könnte, „aus welcher dann weiterhin sowohl Essigsäure wie auch Aceton entstehen können". Wir haben indes, im Gegensatz zu den von Martius zitierten älteren Untersuchern des bakteriellen Citratabbaus, mit *ruhenden* Bakterien *ohne* Zusatz einer N-Quelle gearbeitet; zudem scheint der — neuerdings wiederholt präparativ untersuchte[2]) — Abbau der Glutaminsäure zu Buttersäure auf die Gattung der *anaeroben Bazillen* (*Clostridium*) beschränkt zu sein, denen die Fähigkeit zum *direkten* Citratangriff höchstwahrscheinlich abgeht[3]).

Als Hauptargument für die Auffassung von Martius, „daß nicht nur im Tierkörper, sondern auch in der Bakterienzelle der Citratabbau

[1]) Bio. Z. **13**, 299 (1908).

[2]) H. A. Barker, Enzymol. 2, 175 (1938); D. D. Woods u. Clifton, Biochem. J. **32**, 345 (1938).

[3]) Vgl. hierzu W. Kocholaty u. Hoogerheide, Biochem. J. **32**, 437 (1938).

über Isocitronensäure–Ketoglutarsäure verläuft", bleibt der Nachweis von *Aconitase* (S. 87) in Suspensionen ruhender Bakterien (*B. coli*, *B. prodigiosum*, *B. pyocyaneum*), obwohl der in der zweiten Arbeit von Martius angeführte Versuch an *B. prodigiosum* natürlich nicht darüber zu entscheiden gestattet, ob Citronensäure über Isocitronensäure abgebaut wird oder umgekehrt. Überhaupt muß man unseres Erachtens gerade bei Bakterien mit derartigen teleologischen Beweisen sehr vorsichtig sein, da schon vor längerer Zeit Quastel[1]) gezeigt hat, daß z. B. *B. coli* eine ganze Reihe von Substraten zu *dehydrieren* vermag, mit denen dieser Organismus vermutlich nie in seinem Leben in Berührung kommen wird. Hier spielen sehr stark die Spezifitätsverhältnisse der Bakterienenzyme herein, die in ungewöhnlicher Weise durch Vorbehandlung und Zustand der Zelle bestimmt und modifiziert werden. Darüber hinaus sei an die weite Verbreitung eines Enzyms wie *Glyoxalase* in den verschiedensten Zellen und Geweben[2]) hingewiesen, trotz der heutigen Erkenntnis, daß der *Hauptweg* der Glykolyse (soweit für die Annahme eines Nebenwegs in manchen Fällen überhaupt Veranlassung besteht) bestimmt *nicht* über Methylglyoxal verläuft.

Zur weiteren Prüfung und kritischen Vergleichung unseres Abbauschemas mit den von Martius (und teilweise Walker) vertretenen Mechanismen haben wir sowohl mit *B. pyocyaneum* als auch *B. aerogenes* (aus Hefe) orientierende anaerobe Abbauversuche an den Stoffpaaren *α-Ketoglutarsäure + HCOOH* und *Acetondicarbonsäure + HCOOH* ausgeführt. Da wir stets äquimolare Mengen der beiden Komponenten einsetzten, entspricht also die erste Kombination dem Zustand nach der Primärspaltung IV, die zweite dem Zustand nach der „Isomerisierung" der α- zur β-Ketosäure im Sinne von Martius (S. 87 und 107) und gleichzeitig demjenigen nach der Primärreaktion II (S. 86) von Walker.

Wir haben insgesamt 3 Versuchsreihen ausgeführt, die beiden ersten mit zwei verschiedenen *Pyocyaneum*-Stämmen, die letzte mit einem *Aerogenes*-Stamm (aus Hefe). In der ersten Reihe war die Versuchstemperatur 32°, die Bakterienmenge 40 mg. Da sich unter diesen Bedingungen keine eindeutigen Umsätze beobachten ließen, wurde in den beiden folgenden Reihen durch Erhöhung der Temperatur auf 37° und der

[1]) Biochem. J. **20**, 166 (1926); Erg. Enzymfschg **1**, 209 (1932).

[2]) Literatur bei C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, Suppl. S. 1416 (Den Haag 1938).

Bakterienmenge auf 120 bzw. 180 mg ein Umsatz zu „erzwingen" versucht. Parallelversuche mit *Citronensäure* liefen stets nebenher und zeigten durch ihre normale Ablaufgeschwindigkeit im Vergleich zu früher ausgeführten Ansätzen, daß aktive Bakteriensuspensionen zur Anwendung gekommen waren.

Züchtung und Aufbereitung der Bakterien sowie allgemeine Versuchsanordnung entsprach derjenigen der Ansätze von Tab. 3—6.

A. In den Ansätzen mit α-*Ketoglutarsäure* wurde wie in den Citronensäure-versuchen nach Ablauf der Versuchszeit mit H_2SO_4 angesäuert, bei Wasserbadtemperatur das CO_2 mit N_2 ausgetrieben und in titrierter $Ba(OH)_2$-Lösung aufgefangen. Dann wurden die Bakterien abzentrifugiert, die flüchtigen Säuren abdestilliert und im Destillationsrückstand nach dem Enteiweißen mit $Na_2WoO_4 + H_2SO_4$ durch Zusatz von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 n-HCl die noch vorhandene α-Ketoglutarsäure gefällt und gravimetrisch bestimmt. Kontrollbestimmungen mit bekannter Ketoglutarsäure-menge ergaben, daß bei dieser Aufarbeitungsmethode mit einem Ketosäureverlust von rund 10 Proc. zu rechnen ist. In einem Parallelansatz zu Versuch A der Tab. 11 wurde der Destillationsrückstand der flüchtigen Säuren ohne vorhergehende Enteiweißung mit Äther 10 Stunden lang extrahiert und der Verdunstungsrückstand des Ätherextrakts (376 mg) mit n-NaOH titriert. Laugeverbrauch: 5,2 ccm, entsprechend einem Säureäquivalent von 72,4; berechnet für Ketoglutarsäure 73,0. Die Übereinstimmung zeigt, daß keine bestimmbaren Mengen *Bernsteinsäure* entstanden waren.

B. In den Ansätzen mit *Acetondicarbonsäure* wurde nach Beendigung des Versuchs zunächst durch 5-stündiges Durchleiten von N_2 durch die angesäuerte Lösung bei Zimmertemperatur das CO_2 ausgetrieben. (Die erhaltenen CO_2-Werte sind in den folgenden Tabellen in Klammern wiedergegeben, da ein unbekannter Bruchteil des CO_2 während der Austreibungsperiode entstanden sein kann[1]). Dann wurden die Bakterien abzentrifugiert und die Ansätze halbiert: in der einen Hälfte wurden wie oben die flüchtigen Säuren bestimmt, in der anderen — ohne vorhergehende Enteiweißung — nach S. 95 das Aceton. (Es ist in den folgenden drei Tabellen als Acetondicarbonsäure ausgedrückt, da nach dem eben Gesagten die Verteilung von Aceton und Acetondicarbonsäure am Versuchsende nicht bekannt ist.) Kontrollversuche mit bekannter Säuremenge ergaben bei dieser Bestimmungsmethode ein Defizit von 5—10 Proc. Im Versuch B der Tab. 11 wurde außerdem der Destillationsrückstand der Aceton-

[1]) Bei leicht decarboxylierbaren Ketodicarbonsäuren ist die Zersetzlichkeit der freien Säure und insbesondere des primären Anions erheblich größer als die des sekundären Anions. Vgl. E. O. Wiig, J. phys. Chem. **32**, 961 (1928); W. Franke u. Brathuhn, A. **487**, 1 (1931).

bestimmung, wie unter *A.* angegeben, mit Äther extrahiert. In dem geringfügigen Rückstand des Ätherextrakts war nach der Oxydation mit $KMnO_4$ keine wägbare Bernsteinsäure-menge zu fassen.

Tabelle 10.

Ansätze: 3 Mmol Substrat (als neutrales Na-Salz) in 100 ccm $^m/_{25}$-Phosphatpuffer (p_H 6,8); 40 mg (Trockengewicht) *B. pyocyaneum* (Stamm 2 Hamburg). *Versuchsdauer*: 50 Stunden; $T = 32°$.

Eingesetzt:	A. *α-Ketoglutarsäure* (3 Mmol) + *HCOOH* (3 Mmol)	B. *Acetondicarbonsäure* (3 Mmol) + *HCOOH* (3 Mmol)	C. *Citronensäure* (3 Mmol)
(Zurück) erhalten:			
α-Ketoglutarsäure .	2,54	—	—
Acetondicarbonsäure	—	2,84	—
Citronensäure . . .	—	—	0,9
Flüchtige Säuren. .	3,0	3,0	nicht bestimmt
Davon HCOOH .	2,9	3,0	„ „
CO_2.	nicht bestimmt	nicht bestimmt	2,6

Tabelle 11.

Ansätze: 3 Mmol Substrat in 250 ccm $^m/_{30}$-Phosphatpuffer (p_H 7,0); 120 mg *B. pyocyaneum* (Stamm 1 München). *Versuchsdauer*: 40 Stunden; $T = 37°$.

Eingesetzt:	A. *αKetoglutarsäure* (3 Mmol) + *HCOOH* (3 Mmol)	B. *Acetondicarbonsäure* (3 Mmol) + *HCOOH* (3 Mmol)	C. *Citronensäure* (3 Mmol)
(Zurück) erhalten:			
α-Ketoglutarsäure .	2,45	—	—
Acetondicarbonsäure	—	2,7	—
Citronensäure . . .	—	—	0
Flüchtige Säuren. .	2,8	2,9	nicht bestimmt
Davon HCOOH .	2,8	2,9	„ „
CO_2.	0,35	(3,15)	4,15

Das eindeutige, indes nach den früheren Versuchen und Überlegungen nicht mehr überraschende Ergebnis der Tab. 10 bis 12 ist, daß unter Bedingungen, unter denen Citronensäure *weitgehend* abgebaut wird, α- und β-Ketoglutarsäure im Gemisch mit HCOOH überhaupt nicht angegriffen werden

(Tab. 10); der *vollständigen* Vergärung der Citronensäure in den Tabb. 11 und 12 entspricht zwar ein geringfügiger — bei Berücksichtigung der Fehlergrenze der Bestimmungen 10 Proc. nicht übersteigender — Schwund der beiden Ketoglutarsäuren, der jedoch *nicht* zur Bildung von *Essigsäure* führt.

Tabelle 12.

Ansätze: 3 Mmol Substrat in 250 ccm $^{m}/_{30}$-Phosphatpuffer (p_H 7,0); 180 mg *B. lactis aerogenes* (aus Hefe). *Versuchsdauer*: 40 Stunden; $T = 37^0$.

Eingesetzt:	A. *α-Ketoglutarsäure* (3 Mmol) + *HCOOH* (3 Mmol)	B. *Acetondicarbonsäure* (3 Mmol) + *HCOOH* (3 Mmol)	C. *Citronensäure* (3 Mmol)
(*Zurück*) *erhalten*:			
α-Ketoglutarsäure .	2,38	—	—
Acetondicarbonsäure	—	2,6	—
Citronensäure . . .	—	—	0
Flüchtige Säuren .	2,4	2,45	nicht bestimmt
Davon HCOOH .	2,4	2,33	„ „
CO_2	0,6	(2,66)	4,05

Was hierbei aus den beiden Ketosäuren entsteht, haben wir — als außerhalb unseres Programms liegend — nicht untersucht. Es ist jedoch — zum mindesten für den Versuch mit *Aerogenes* (Tab. 12), in dem gleichzeitig ein nicht unerheblicher HCOOH-Schwund festzustellen ist — recht wahrscheinlich, daß die (nach S. 106 thermodynamisch stark begünstigte) Reduktion zu den entsprechenden *Oxyglutarsäuren* stattfindet.

VI. Aerobe Versuche mit Citronensäure und den vermuteten Zwischenstufen ihres Abbaus.

In diesen abschließenden Versuchen sollte nochmals, und zwar unter Bedingungen, die von den bisher angewandten möglichst abwichen, die Frage geprüft werden, welche Verbindungen als Intermediärprodukte des bakteriellen Citratabbaus in Betracht kämen. Geeignet hierzu erschien die aerobe manometrische Methodik nach Barcroft-Warburg, einmal wegen ihrer Einfachheit und Eignung zu Reihenversuchen, dann wegen der Möglichkeit, auch die *Kinetik* stärker als bisher zur Entscheidung heranzuziehen. Hauptkriterium für die mögliche Funktion einer Substanz als Zwischenstufe ist dabei,

daß sie nicht langsamer angegriffen wird als das Ausgangssubstrat, wobei allerdings nach den neueren Erfahrungen unter Umständen mit sekundären Komplikationen, wie gesteigerte Reaktionsfähigkeit eines Stoffes in statu nascendi[1]), Hemmung durch zu hohe Substratkonzentration[2]), sowie durch optische Antipoden[3]), zu rechnen ist.

Wir geben zunächst zwei typische Versuchsreihen dieser Art, ausgeführt an je einem Stamm von *B. pyocyaneum* und *B. lactis aerogenes* (aus Hefe) in den Fig. 3 und 4 wieder.

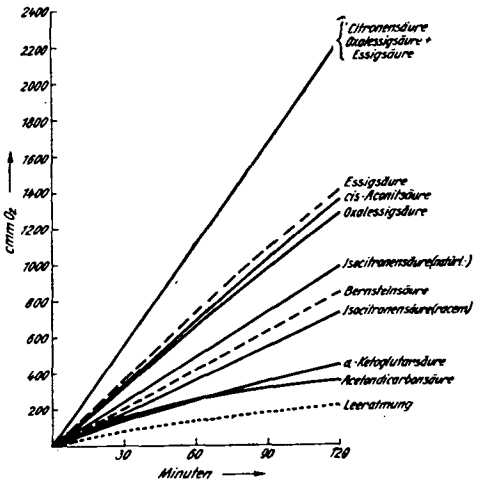


Fig. 3.

B. pyocyaneum und verschiedene Substrate.

Die verwendeten Bakterien waren jeweils 48 Stunden auf dem S. 91 angegebenen synthetischen Citratnährboden anaerob gezüchtet worden. Die Ansätze, die bei 37° unter Luft liefen, waren folgendermaßen zusammengesetzt:

2 ccm Bakterien-suspension (15 mg Trockengewicht bei *B. pyocyaneum*, 10 mg bei *B. lactis aerogenes*);
1 ccm $^{m}/_{5}$-Phosphatpuffer (p_H 6,8);
2 ccm $^{m}/_{50}$-Substratlösung (als neutrales Na-Salz).

---

[1]) Vgl. z. B. H. Wieland, Helv. **15**, 521 (1932); J. Weichherz u. Nord, Protopl. **10**, 41 (1930).

[2]) Vgl. z. B. W. Franke u. Peris, Bio. Z. **295**, 61 (1937).

[3]) Vgl. H. Wieland, Crawford u. Walch, A. **525**, 119 (1936).

Wir haben das grundsätzliche Ergebnis der in den Fig. 3 und 4 wiedergegebenen Versuche in zahlreichen weiteren Versuchsreihen, in denen teils die verwendeten Bakterienstämme, teils die Züchtung und Vorbehandlung der Organismen variiert wurden, stets bestätigen können, wenn auch im einzelnen

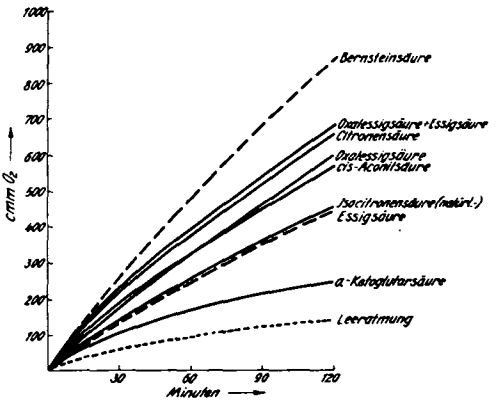


Fig. 4.

B. lactis aerogenes und verschiedene Substrate.

kleinere quantitative Abweichungen bestanden. Tab. 13 enthält in abgekürzter Form eine Zusammenstellung einiger weiterer derartiger Versuchsdaten.

Tabelle 13.

	ccm O_2					
	B. pyocyaneum			*B. lactis aerogenes*		
	60′		120′	60′		120′
Leeratmung	75	(100)	135	85	(70)	135
Citronensäure	1140	(910)	2160	370	(500)	660
Oxalessigsäure + Essigsäure	1050	—	2170	—	—	—
Oxalessigsäure	500	(575)	1100	—	—	—
Essigsäure	800	—	1450	—	—	—
cis-Aconitsäure	635	—	1450	—	—	—
Isocitronensäure (natürl.—).	420	—	560	225	—	420
„ (racem.) .	200	(175)	380	—	(100)	—
α-Ketoglutarsäure	—	(140)	—	—	(175)	—
Acetondicarbonsäure . . .	—	(130)	—	—	—	—

Der Versuchsansatz war der oben angegebene mit durchweg 10 mg Bakterien. Bei beiden Bakterienarten handelt es sich um je zwei mit

verschiedenen Kulturen ausgeführte Versuchsreihen, von denen im einen Falle die 1- und 2-Stunden-Werte, im anderen (in Klammern) nur die 1-Stunden-Werte der O_2-Aufnahme mitgeteilt werden.

Als wichtigstes Ergebnis der Versuche dieses Abschnitts sehen wir die Tatsache an, daß alle durch die Theorien von Martius und Walker in Betracht gezogenen Intermediärstufen auch unter *aeroben* Bedingungen zu langsam angegriffen werden, um die tatsächliche Geschwindigkeit des oxydativen Citronensäure-abbaus erklären zu können. Im besonderen scheiden *α-Ketoglutarsäure* und *Acetondicarbonsäure*, genau wie in den *anaeroben* Versuchen (S. 111 f.), infolge ihrer außerordentlichen Reaktionsträgheit von vorne herein aus. Beachtenswert erscheint uns ferner die Geschwindigkeitsabstufung innerhalb der Gruppe der *C_6-Tricarbonsäuren*: die der Citronensäure noch näher stehende *cis-Aconitsäure* wird einwandfrei rascher oxydiert als die natürliche *Isocitronensäure*[1]), die doch nach Martius Primärsubstrat der Dehydrierung sein sollte. Die einfachste Erklärung hierfür dürfte wohl die sein, daß *beide* Säuren über *Citronensäure* abgebaut werden und daß die einfache Rückhydratisierung der Aconitsäure rascher verläuft als die — vielleicht enzymatisch komplexere — Isomerisierung der Isocitronensäure zu Citronensäure.

Was die unterlegene Umsatzgeschwindigkeit der *racemischen* gegenüber der *natürlichen* (—)-Isocitronensäure anbetrifft, so läßt sich aus unseren bei stets gleicher *molarer* Konzentration durchgeführten Versuchen nicht entscheiden, ob im ersteren Falle lediglich die auf die Hälfte *verminderte Konzentration* an dem — vielleicht von den Bakterien ausschließlich umgesetzten — natürlichen Antipoden maßgebend ist oder aber ob ein wahrer *Hemmungseffekt* des anderen Antipoden vorliegt, wie er z. B. beim Äpfelsäure-umsatz durch Hefe-Aerogenes von Wieland u. Mitarbeitern (a. a. O., S. 113) festgestellt worden ist. Selbst wenn — was wahrscheinlich ist — das Letztere der Fall wäre, würden hiervon doch die früheren anaeroben Versuche Deffners mit racemischer Isocitronensäure (a. a. O., S. 85), bei denen ein im Vergleich zu Citronensäure nur sehr geringfügiger Umsatz zu verzeichnen war, in keinem wesentlichen Punkte betroffen werden. Die von Martius in seiner 2. Mitteilung (1938) anhangsweise ausgesprochene Vermutung, daß der Mißerfolg Deffners mit Isocitronensäure auf die Verwendung *racemischer* Säure zurückgehe,

[1]) Für die liebenswürdige Überlassung von etwa 200 mg optisch aktiver Isocitronensäure danken wir Herrn Doz. Dr. habil. C. Martius bestens.

wird jedenfalls durch die nunmehr experimentell bewiesene Tatsache widerlegt, daß auch die *natürliche*, optisch aktive Verbindung von Bakterien immer noch erheblich langsamer angegriffen wird als Citronensäure.

Wir halten es für keinen Zufall, daß bei beiden untersuchten Bakterienspezies das äquimolekulare Gemisch von *Oxalessigsäure* + *Essigsäure* — trotz stark variierender Reaktionsgeschwindigkeit der Komponenten — gleich rasch oxydiert wird wie *Citronensäure*. Die Identität des Verhaltens beider Systeme, auf die schon bei den *anaeroben* Versuchen zu wiederholten Malen hingewiesen worden ist und die wir als das vielleicht beweiskräftigste Argument zugunsten unseres Abbauschemas betrachten, findet so auch auf dem Gebiet des *aeroben* Citratabbaus weitere Bestätigung. Nichts spricht zum mindesten dagegen — und hier tritt erneut die Analogie zum desmolytischen *Kohlehydrat*abbau zutage —, daß die *Verbrennung* ebenso wie die *Vergärung* der Citronensäure durch die Bakterienzelle über jene primäre „Desaldolisierung" erfolgt.

Der eine von uns (M. D.) dankt der Universität Athen für das ihm gewährte Stipendium aus der Voltos-Stiftung.

Nachschrift: Nach Fertigstellung dieser Untersuchung erschien in der „Enzymologia" **6**, 273 (1939) eine Arbeit von C. R. Brewer u. Werkman über „The anaerobic dissimilation of citric acid by *Aerobacter indologenes*", in der das von Deffner bereits vor einem Jahr [A. **536**, 44 (1938)] entwickelte und in der vorliegenden Veröffentlichung von uns in seiner allgemeinen Gültigkeit für den bakteriellen Citratabbau erkannte Schema in allen wesentlichen Punkten übernommen wird, ohne daß diese Tatsache in der Arbeit der genannten Autoren — bei der Fülle sonstiger zitierter Literatur — hinreichend zum Ausdruck käme. Die kurze vorläufige Mitteilung von Brewer u. Werkman [J. Bact. **36**, 657 (1938)], auf die sich die Verfasser beziehen und mit der „die Ergebnisse Deffners in mehrfacher Hinsicht Übereinstimmung zeigen" sollen, enthält lediglich die Angabe, daß die Hauptprodukte der Citronensäure-vergärung durch *Aerobacter indologenes* Ameisensäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, CO_2 und H_2 sind, wozu noch kleine Mengen von Acetyl-methylcarbinol, 2,3-Butylenglykol, Äthylalkohol und Milchsäure kommen; ferner daß der bakterielle Citratabbau durch verschiedene Enzymgifte wie Arsenit, Bisulfit, Jodacetat und NaF aerob und anaerob in wechselndem Ausmaß hemmbar ist; schließlich daß der „Citronensäure-cyclus" von Krebs u. Johnson [Enzymol. **4**, 148 (1937)] — der im Prinzip den Abbau über α-Ketoglutarsäure, den Wiederaufbau über Oxalessigsäure annimmt — für den bakteriellen Dissimilationsvorgang keine Gültigkeit besitzt. Von der Schlüssel-

stellung der *Oxalessigsäure* beim Citratabbau durch Bakterien enthält diese kaum $^1/_2$ Seite umfassende Mitteilung indes kein Wort. In der soeben erschienenen ausführlichen Veröffentlichung finden sich sehr sorgfältig ausgeführte und gut stimmende Bilanzen unter Berücksichtigung aller Nebenprodukte (die jedoch keineswegs für den *Citronensäure*-abbau durch *Aerogenes* charakteristisch sind, sondern sich — in teilweise erheblich größerer Menge — auch beim *Glucose*-abbau finden). Ferner wird der Einfluß der „Gewöhnung" an einem Beispiel erläutert sowie eine Zusammenstellung der durch den Organismus vergärbaren und nichtvergärbaren Substrate gegeben; unter den ersteren findet sich keines, das nicht schon von Wieland und seiner Schule am Hefe-*Aerogenes* präparativ untersucht worden wäre, unter den letzteren merkwürdigerweise die Aconitsäure, wohl sicher wegen Verwendung des ungeeigneten *trans*-Isomeren, dessen Reaktionsträgheit schon vom tierischen Citratabbau her bekannt ist. Trotz interessanter Einzelheiten, welche die Arbeit der amerikanischen Autoren enthält, muß hier doch nochmals daran festgehalten werden, daß ihr Hauptergebnis, das mit dem unsrigen identische Abbauschema der Citronensäure, schon vor Jahresfrist von Deffner an einem — wie die Autoren richtig vermuten — mit ihrem *Aerobacter indologenes* nahe verwandten Mikroorganismus gewonnen und publiziert worden ist.

Zur Kenntnis der sog. Glucose-oxydase. II;

von *Wilhelm Franke* und *Michael Deffner*.

Mit 2 Figuren im Text.

(Eingelaufen am 22. August 1939.)

Vor rund 2 Jahren haben Franke und Lorenz[1]) die Glucose-oxydase der Schimmelpilze, deren Entdeckung und erste Beschreibung man D. Müller[2]) verdankt, einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Das wesentlichste Ergebnis der Arbeit war gewesen, daß dieses Oxydationsenzym zwar nicht — wie Müller angenommen hatte — *ausschließlich*, aber doch sehr *bevorzugt* mit *Sauerstoff* reagiert, insofern als daneben nur chinoide Verbindungen hohen Redoxpotentials (wie Chinon und Indophenole) als H-Acceptoren zu fungieren

[1]) I. Mitt. A. **532**, 1 (1937).

[2]) Bio. Z. **199**, 136 (1928); **205**, 111 (1929); **213**, 211 (1929); **232**, 423 (1931); Erg. Enzymforsch. **5**, 259 (1936).

vermochten; ferner, daß sich bei der Reaktion mit O_2 der — von Müller vergeblich versuchte — Nachweis von *Hydroperoxyd* bei geeigneter Vergiftung der in den Enzympräparaten stets vorhandenen Katalase mit u. U. *quantitativer* H_2O_2-Ausbeute führen läßt. Aus diesen Gründen, zu denen noch die Unempfindlichkeit des Ferments gegen Schwermetallkomplexbildner (wie HCN, H_2S, NaN_3, CO), die recht strenge Substratspezifität und einige weitere, minder bedeutsame Argumente kamen, rechneten wir die Glucose-„oxydase" — im Gegensatz zu der schon in der Benennung zum Ausdruck kommenden Auffassung D. Müllers — zu den *Dehydrasen*, und zwar zur Untergruppe der *Aero-dehydrasen* oder — nach Oppenheimer[1]) — *Oxhydrasen.*

Die Zahl dieser besonders acceptorspezifischen „*Pseudooxydasen*" — denen weiterhin noch die Unabhängigkeit ihrer Wirkung von der Gegenwart eines *dialysierbaren* „Coferments" gemeinsam ist — befindet sich in stetem Zunehmen; sie umfaßt heute die *oxytropen Dehydrasen*[2]) der Glucose, der Oxalsäure, Ascorbinsäure, Dioxymaleinsäure, der d-Aminosäuren, der Monoamine (Tyraminase), der Diamine (Histaminase) sowie der Harnsäure (Uricase)[3]).

[1]) Die Fermente u. ihre Wirkungen, Suppl. S. 1164 (Den Haag 1937).

[2]) Zusammenfassung von W. Franke bei Bamann-Myrbäck, D. Methoden d. Fermentforsch., im Druck (Leipzig 1940).

[3]) In einigen Fällen (Ascorbino-, Dioxymaleino-, Diamino-oxydase, Uricase) scheint das oben angeführte Kriterium der *HCN-Unempfindlichkeit* nicht oder nur bedingt zu gelten. Wie schon Franke u. Lorenz in der 1. Mitteilung abschließend betont haben, liegen die Verhältnisse hier im einzelnen wenig übersichtlich. Bei der *Histaminase* ist es nach Zeller [Helv. **21**, 880, 1645 (1938)] zum mindesten zweifelhaft, ob HCN an einem aktiven Schwermetallatom angreift. Wir halten es aber für durchaus denkbar, daß die Gruppe der Oxhydrasen in *schwermetallhaltige* und *schwermetallfreie* zu unterteilen ist. Manches spricht dafür, daß an der Wirkung der Ascorbinsäure-oxydase *Kupfer* [C. G. King u. Mitarb., J. biol. Chem. **119**, 511 (1937); **128**, 455 (1939); N. Ito, Bull. agric. chem. Soc. Jap. **14**, 9 (1938); E. Silverblatt u. King, Enzymol. **2**, 222 (1938)], an derjenigen der Dioxymaleinsäure-oxydase *Mangan* [H. Theorell u. Swedin, Naturwiss. **27**, 95 (1939)] und an der Uricasewirkung — nicht häminartig gebundenes — *Eisen* [J. N. Davidson, Biochem. J. **32**, 1386 (1938)] beteiligt ist. [Vgl. jedoch zum letztgenannten Punkte C. G. Holmberg, Nature **143**, 604 (1939)].

Als wesentlichsten, richtungweisenden Fortschritt, der in der Erforschung dieser Enzymgruppe in den letzten Jahren erzielt worden ist, betrachten wir die Warburg und Christian[1]) sowie Negelein und Brömel[2]) (1938/39) geglückte „Konstitutions"aufklärung der *d-Aminosäure-oxydase.* Sie fanden, daß sich in diesem Ferment an einen Eiweißkörper ein *Alloxazin-adenin-dinucleotid* als prosthetische Gruppe bindet, deren reversibel oxydier- und reduzierbarer *Flavin*anteil die Oxhydrase in die Klasse der „gelben Fermente"[3]) einreiht. Bald darauf hat E. G. Ball[4]) im Warburgschen Institut auch das altbekannte Schardinger-*Enzym* (bzw. die *Xanthin-dehydrase*) der Milch — von den vorerwähnten Oxhydrasen (im engeren Sinne) lediglich durch seine zu O_2 wie zu anderen Acceptoren ziemlich *gleichmäßig* entwickelte Affinität unterschieden — als „gelbes Ferment" mit einer dem erwähnten Dinucleotid ähnlichen, vielleicht zu einem Teil sogar damit identischen Wirkgruppe erkannt. Da auch in der Gruppe der Oxhydrasen offenbar alle Übergänge von fehlender über angedeutete [Aminosäure-[5]) und Monoamin-oxhydrase[6])] zu ausgesprochener Fähigkeit zur anaeroben Acceptorhydrierung (Glucose-oxydase, vgl. auch später S. 141 f.) bestehen, gewinnt der Grenzfall des Schardinger-Enzyms in diesem Zusammenhang gleichfalls erhebliches Gewicht. (Über weitere, in allerletzter Zeit als „Alloxazinproteide" erkannte Oxydationsfermente — die „Diaphorasen" = Dehydrasen der Dihydro-codehydrasen — vgl. Tab. 18, S. 149.)

In der Untersuchung von Franke und Lorenz waren fast durchweg Enzym-*Rohpräparate* zur Verwendung gekommen, die durch Alkohol-Atherfällung von Pilzpreßsäften

---

[1]) Bio. Z. **298**, 150 (1938).

[2]) Bio. Z. **300**, 225 (1939).

[3]) Grundsätzliche Bemerkungen hierzu bei O. Warburg u. Christian, Bio. Z. **298**, 368 (1938).

[4]) J. biol. Chem. **128**, 51 (1939).

[5]) H. A. Krebs, Biochem. J. **29**, 1620 (1935); F. u. M. L. C. Bernheim, J. biol. Chem. **109**, 131 (1935); **111**, 217 (1935).

[6]) F. J. Philpot, Biochem. J. **31**, 856 (1937).

— dargestellt nach dem Verfahren von Buchner — gewonnen worden waren. Bisweilen war durch Wiederauflösen der Niederschläge, Dialyse und erneute Fällung eine oberflächliche Reinigung durchgeführt worden. Die *Atmungsgröße* Q_{O_2} (= cmm O_2/mg Enzym × Stunden) unserer reinsten Präparate lag unter den — nichtoptimalen — Bedingungen des Testversuchs in der Nähe von 50, unter optimalen Bedingungen war sie $2^1/_2$—3-mal größer. Die *Anreicherung*, bezogen auf die Aktivität des Pilzmycels, war etwa 4—10-fach. Da die Enzympräparate sich sowohl im gelösten wie insbesondere im festen Zustand als sehr gut haltbar erwiesen, erschien der Versuch einer weiteren Reinigung lohnend und war schon in der 1. Mitteilung in Aussicht gestellt worden.

Drei Möglichkeiten hinsichtlich der Natur der *aktiven Gruppe* in der Glucose-oxydase — vielleicht auch in anderen Aero-dehydrasen — zogen wir zu Beginn der vorliegenden Untersuchung als Arbeitshypothesen in Erwägung: 1. Die Glucose-oxydase mochte ein *aktives Schwermetall-atom*, etwa *Kupfer* oder *Mangan* enthalten; 2. sie konnte ein fest gebundenes *Redoxsystem von Farbstoffcharakter* besitzen; 3. sie mochte ein *farbloses Überträgersystem* fest, d. h. nicht abdialysierbar gebunden enthalten, z. B. ein Pyridin-nucleotid (eine „Codehydrase").

Für die Möglichkeit 1 sprachen ältere Versuche von H. A. Krebs[1]), der die Autoxydation von Glucose (und anderen Zuckern) in schwach alkalischer Lösung durch geringe Schwermetallzusätze — und zwar durch Cu und Mn viel stärker als durch Fe — katalytisch beschleunigen konnte. Für diese Autoxydation, bei der nach den Angaben von Krebs auffallend *wenig* CO_2 und nach eigenen orientierenden Versuchen eine *Säure* entsteht, ist offenbar die freie Carbonylgruppe notwendig, da zwar Robison-, nicht aber Harden-Young-Ester sich als autoxydabel erweisen[2]). Für *Kupfer* im besonderen sprach das ungewöhnlich hohe katalytische Vermögen dieses Metalls bei der *Ascorbinsäure*-oxydation — auch in Proteinbindung (vgl. Lit. in Fußnote 3, S. 118) —, woraus bisweilen — wohl zu Unrecht[3]) — auf die Nichtexistenz einer *spezifischen* Ascorbino-oxhydrase geschlossen wurde; ferner war die Tatsache bemerkenswert, daß sich bei der Autoxydation von Cu^I, im Gegensatz

[1]) Bio. Z. **180**, 377 (1927).
[2]) O. Meyerhof u. Lohmann, Bio. Z. **185**, 113 (1927).
[3]) F. B. Straub, H. **254**, 205 (1938).

zu Fe^{II}, *Hydroperoxyd* nachweisen läßt[1]). Ein *Mangan*-gehalt der Glucose-oxydase andrerseits war nach Angaben von Bernhauer[2]), der bei *wachsendem Mycel* Aktivierung der Gluconsäuregärung durch $MnSO_4$-Zusatz gefunden hatte, nicht unwahrscheinlich. Für die *Dioxymaleino-oxydase* ist die Beteiligung von Mangan zudem auch am *isolierten Ferment* äußerst wahrscheinlich gemacht worden (Lit. Fußnote 3, S. 118). Schließlich war in diesem Zusammenhang der von Warburg[3]) erhobene Befund *HCN-unempfindlicher* Mangan-katalysen im Auge zu behalten.

Für Fall 2 mochte man eine Stütze sehen in der schon in der 1. Mitteilung angegebenen schwachen *Gelbfärbung* konzentrierterer Enzymlösungen; ferner war die HCN-Unempfindlichkeit und die H_2O_2-Bildung nach den Erfahrungen beim Flavinferment[4]) für diesen Fall besonders zwanglos zu deuten. Die später hinzukommenden, schon erwähnten Befunde Warburgs und Balls an der Aminosäure-oxhydrase bzw. dem Schardinger-Enzym stellten natürlich analogiemäßig einen starken zusätzlichen Hinweis in Richtung der Möglichkeit 2 dar.

Für die Möglichkeit 3 sprach die bereits von Franke u. Lorenz hervorgehobene Übereinstimmung von Glucose-*dehydrase* (z. B. der Leber) und Glucose-*oxydase* in verschiedenen wesentlichen Punkten (wie Substratspezifität und -affinität, Hemmbarkeit durch Sulfit) sowie die offenbare Existenz von *Übergangsformen* [etwa in Essigbakterien[5])]. Der Übergang vom dialysablen „*Coferment*" zum festgebundenen „*Agon*" würde diesen Verhältnissen formal gut gerecht werden, wenngleich natürlich die im letzteren Grenzfall anzunehmende Reaktionsfähigkeit einer Codehydrase gegenüber O_2 ohne zusätzliche Annahmen schwer verständlich bleibt. (Eine intramolekulare Kombination der Gruppierungsmöglichkeiten 2 + 3 könnte diese Schwierigkeit grundsätzlich beseitigen; vgl. hierzu S. 148.)

Unsere Reinigungsversuche an der Glucose-oxydase haben, um das wesentliche Ergebnis gleich vorwegzunehmen, zu Präparaten mit einer Atmungsgröße von fast 3000 unter den üblichen Testbedingungen, rund 8000 unter optimalen Bedingungen geführt[6]). Der Anreicherungsgrad liegt — je

---

[1]) H. Wieland u. Franke, A. **473**, 289 (1929).

[2]) H. **177**, 86 (1928).

[3]) Bio. Z. **231**, 493; **233**, 245 (1931).

[4]) Vgl. z. B. Zusammenfassung von H. Theorell, Erg. Enzymforsch. **6**, 111 (1937).

[5]) K. Tanaka, Acta phytochim. **7**, 265 (1933).

[6]) An den ersten Reinigungsstufen — bis etwa $Q_{O_2} = 200$ — hat sich noch Herr Dr. F. Lorenz beteiligt, wofür ihm an dieser Stelle gedankt sei.

nach dem verwendeten Ausgangsmaterial — zwischen 250- und 600-fach. Gewichtige Gründe sprechen schon beim jetzt erreichten Reinheitsgrad mit einer sehr großen Wahrscheinlichkeit dafür, daß auch die Glucose-oxydase ein *gelbes Ferment* ist. Indessen glauben wir, daß wir vom *reinen* Ferment auch heute noch ziemlich weit entfernt sind; seine Gewinnung ist allerdings im jetzigen Stadium der Arbeit lediglich mehr eine Materialfrage. Wir veröffentlichen unsere Ergebnisse schon jetzt, weil der eine von uns (M. D.) aus äußeren Ursachen an einer weiteren Bearbeitung des Problems leider verhindert ist; die Versuche zur Reindarstellung des Ferments werden jedoch demnächst fortgesetzt werden.

I. Das Ausgangsmaterial.

A. Vorkommen der Glucose-oxydase. Durch *Isolierung* ist das Ferment bisher nur in *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* nachgewiesen worden. Wohl aber ist für eine Reihe anderer Pilze Gluconsäure-bildung durch wachsendes Mycel bekannt[1]).

Nach D. Müller[2]) ist „außer in *Asp. niger* und *Pen. glaucum* Glucose-oxydase vielleicht in den folgenden Pilzgattungen, unter welchen einige Arten Gluconsäure im Substrat bilden, zu suchen: *Citromyces, Dematium, Fumago, Microanthomyces, Mucor, Polyporus*". In *Asp. oryzae*, der für seine Fähigkeit zur Kojisäure-bildung bekannt ist, hat Müller bei Isolierungsversuchen keine Glucose-oxydase entdecken können.

Wir haben auf der Suche nach dem vorteilhaftesten Ausgangsmaterial für präparative Enzymdarstellung verschiedene Pilze vergleichend auf ihren Enzymgehalt untersucht, und zwar die Aspergillaceen *Asp. niger*, *Asp. fumigatus*, *Pen. glaucum* und *Citromyces*, die Mucoraceen *Mucor racemosus* und *Rhizopus nigricans* sowie schließlich *Dematium pullulans* [aus der Gruppe der Fungi imperfecti[3])]. Das

[1]) Lit. bei K. Bernhauer, Die oxydativ. Gärungen, S. 15 (Berlin 1932); ferner Erg. Enzymforsch. **3**, 185 (1934).

[2]) Erg. Enzymforsch. **5**, 185 (1936).

[3]) Für die kostenlose Überlassung von Pilzkulturen sind wir Herrn Hauptkonservator Dr. Esenbeck und Herrn Prof. Dr. Gistl von den Botanischen Instituten der hiesigen Universität bzw. Techn. Hochschule zu großem Dank verpflichtet.

Ergebnis dieser Versuche war, daß sich lediglich aus *Asp. niger*, *Pen. glaucum* und *Citromyces* Glucose-oxydase *einwandfrei* isolieren ließ.

Die *Züchtung der Pilze* sowie die *Aufbereitung des Mycelmaterials* erfolgte nach dem in der 1. Mitteilung angegebenen Verfahren. (Um bei den beiden *Mucoraceen* ein gutes Wachstum zu erzielen, bleibt der Citronensäure-zusatz in der dort verwendeten Nährlösung weg.) *Aktivitätsbestimmungen* wurden sowohl an den *dialysierten Preßsäften* wie an den daraus gewonnenen *Trockenpräparaten* vorgenommen; dies geschah, um nicht durch eine bei der Alkohol-Ätherbehandlung möglicherweise eingetretene Enzym-inaktivierung zu falschen Schlüssen hinsichtlich des ursprünglichen Enzymgehalts im Preßsaft verleitet zu werden. Doch erfolgte nur beim *Citromyces*-Enzym in der erwähnten Phase eine Aktivitätsverminderung um etwa die Hälfte.

Auf die Mitteilung von *Zahlenwerten* für Enzymaktivitäten und -ausbeuten soll hier verzichtet werden, da zwischen den einzelnen Stämmen der gleichen Art nicht unerhebliche Unterschiede bestehen und auch die (öfters überimpften) Stammkulturen ursprünglich aktiver Stämme (auf Bierwürze-Agar) bisweilen im Verlauf längerer Zeiträume (z. B. 1 Jahr) aus unbekannten Gründen die Fähigkeit zur Glucoseoxydasebildung — anscheinend im Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Conidienbildung — in zunehmendem Maße einbüßten[1]). In diesem Sinne sind auch unsere *negativen* Befunde mit gewissem Vorbehalt aufzunehmen, da wir über das Alter der einzelnen übernommenen Kulturen nicht unterrichtet waren.

Nach wie vor bleiben *Asp. niger* und *Pen. glaucum* die besten Ausgangsmaterialien für die Fermentdarstellung. Gute Stämme der beiden Spezies liefern Enzymlösungen und Trockenpräparate vergleichbarer Wirksamkeit. In der Praxis ist jedoch *Asp. niger* vorzuziehen, und zwar aus folgenden Gründen: 1. Er wächst wesentlich rascher als *Pen. glaucum*;

[1]) Vgl. ähnliche Beobachtungen von O. E. May, Herrick, Moyer u. Hellbach, Ind. Eng. Chem. **21**, 1198 (1929).

2. bei gleicher Kulturoberfläche und jeweils optimalen Wachstumsbedingungen sind die Mycelausbeuten an *Asp. niger* 2—3-mal größer als die an *Pen. glaucum*; 3. bei *Aspergillus*-präparaten liegt die „Eigenatmung" in der Nähe von 5 bis 10 Proc., bei *Penicillium*-präparaten selten unter 20 Proc. der „Glucoseatmung". *Citromyces* — von dem wir allerdings nur *einen* Stamm untersucht haben — steht in der Wachstumsintensität zwischen *Aspergillus* und *Penicillium*, liefert aber erheblich (z. B. 2—3-mal) schwächere Enzymlösungen, aus denen sich zudem nur mit großem Verlust Trockenpräparate herstellen ließen.

Unsere negativen Ergebnisse mit *Asp. fumigatus*, der wie *Asp. oryzae* zu den Kojisäure-bildnern gehört, passen zu den vorerwähnten analogen Befunden Müllers und zeigen zusammen mit diesen, daß das Vorkommen der Glucose-oxydase keineswegs für die *Gesamtfamilie der Aspergillaceen* typisch ist. Auch in *Asp. niger* und *Pen. glaucum* wird sie übrigens nach den Untersuchungen Müllers nur bei Kultur der Organismen auf geeigneten Zuckern gebildet, sie stellt also kein *konstitutives*, sondern nur ein *adaptives* Enzym [im Sinne Karströms[1])] dar; ersichtlich geht der Zuckerabbau auch in den beiden letztgenannten Aspergillaceen nicht *zwangsläufig* über Gluconsäure.

Bei den beiden *Mucoraceen* bewirkte Zusatz von Glucose zu den dialysierten Preßsäften nicht nur keine Steigerung, sondern sogar eine Hemmung der recht beträchtlichen „Leeratmung". Bei *Dematium* haben wir unter den gleichen Bedingungen zwar deutliche O_2-Mehraufnahmen nach Glucosezusatz beobachtet, doch ließ sich aus den relativ kleinen Differenzen gegenüber der — auch hier erheblichen — Eigenatmung nicht *mit Sicherheit* auf die Anwesenheit von Glucose-oxydase schließen.

Erwähnt soll noch werden, daß das Enzym außer in den vegetativen Zellen auch in den *Conidiosporen* von *Asp. niger* und *Pen. glaucum* nachgewiesen werden konnte. Die enzymatische Aktivität der Sporen betrug im letzteren Falle, wo sie besonders leicht und rein geerntet werden können, rund die Hälfte der Mycelaktivität. Eine Isolierung der Sporen-oxhydrase ist nicht versucht worden.

Im übrigen ist die Verbreitung der Glucose-oxydase nicht, wie es bisher den Anschein hatte, auf das *Pflanzen*reich beschränkt. A. Gauhe[2]) konnte kürzlich im hiesigen

[1]) H. Karström, Erg. Enzymforsch. 7, 350 (1938).
[2]) Vgl. A. Gauhe, Z. vgl. Physiol., erscheint 1940.

Institut zeigen, daß das Pharynxdrüsen-sekret der *Biene* ein glucose-oxydierendes Enzym enthält, das in allen wesentlichen Eigenschaften mit dem Pilzenzym übereinstimmt.

B. Mycelalter und -aktivität. Nach D. Müller[1]) ist es wichtig, möglichst junge Pilzdecken, bei denen die Conidienbildung noch nicht oder kaum begonnen hat, zur Enzymdarstellung zu verwenden, da andernfalls schon viel tote Zellen im Ausgangsmaterial vorhanden sind. Da sich diese Forderung bei dem raschen Wachstum der Schimmelpilze oft schwer (z. B. wenn der geeignete Zeitpunkt Nachts erreicht wird) erfüllen läßt, haben wir zur Orientierung den *Einfluß der Züchtungsdauer* auf die enzymatische Mycelaktivität untersucht[2]).

Zu diesem Zwecke wurde Mycel von *Asp. niger* nach bestimmten Bebrütungsdauern bei 35° gemäß der Müllerschen Vorschrift „verarmt", gewaschen und in der Reibschale zu einem möglichst homogenen Brei verarbeitet. Nach dem Verdünnen mit Wasser wurde die O_2-Aufnahme von 2 ccm Mycelsuspension (von bekanntem bei 110° bestimmtem Trockengewicht) in Abwesenheit und Gegenwart von Glucose bei 30° unter Luft bestimmt. Die Zusammensetzung der Reaktionslösung — im folgenden stets als „Normalansatz" bezeichnet — war die folgende:

2 ccm Mycelsuspension (bzw. Enzymlösung),
2 ccm m/5-Phosphatpuffer (p_H 6,8),
1 ccm H_2O bzw. m/1-Glucose.

Die Eigenatmung des Mycels betrug in diesen Versuchen höchstens 5 Proc. der Glucose-atmung; sie ist in den *O_2-Werten* der nachstehenden Tabelle nicht abgezogen. Letztere enthält außerdem noch das eingesetzte *Myceltrockengewicht*, die aus cmm O_2/mg Trockengewicht × Stunden berechnete *Atmungsgröße* Q_{O_2} sowie (am Kopf) Angaben über *Mycelalter* und *-aussehen*.

Wie Tab. 1 erkennen läßt, ist zwar die Mycelaktivität im „Flocken- und Insel-stadium" erheblich größer als im „Decken-stadium", erweist sich aber in letzterem als zeitlich recht konstant und ersichtlich nicht von der Conidienbildung abhängig. Für den praktischen Zweck der Enzymgewinnung

[1]) Bei Oppenheimer-Pincussen, Die Methodik d. Fermente, S. 486 ff. (Leipzig 1929).

[2]) Versuch von F. Lorenz.

ist jedoch noch zu berücksichtigen, daß die *Mycelgewichte* bis zur Deckenbildung sehr stark, dann langsamer zunehmen. (Sie standen z. B. für gleich große Petri-Schalen nach 2, 4, 6 und 10 Tagen im Verhältnis von etwa 1 : 7 : 8 : 9.) Wir haben uns daher zwar nach Möglichkeit an die Müllersche Vorschrift hinsichtlich des Mycelstadiums gehalten, haben aber des öfteren auch stärker conidienbedeckte Mycelien verwendet, ohne je einen nachteiligen Einfluß auf die Enzymausbeuten feststellen zu können.

Tabelle 1.

Mycel					
	a) Alter . .	2 Tage	4 Tage	6 Tage	10 Tage
	b) Aussehen	Einzelne Flocken und „Inseln"	Zusammenhängende dünne reinweiße Decke	Mäßige Conidienbildung	Starke Conidienbildung, Myceloberfläche tief braunschwarz
cmm O_2/Stunden .		94	47	97	36
mg Trockengewicht		2,4	3,3	7,5	2,4
Q_{O_2}		**39**	**14**	**13**	**15**

Im Versuch der Tab. 1 war mit einem schon etwas „ermüdeten" *Aspergillus*-stamm und mit relativ schwacher Beimpfung gearbeitet worden. Bei gut aktiven Stämmen und starker Sporenimpfung verkürzen sich die für die einzelnen Stadien angegebenen Zeiten auf etwa die Hälfte. Im allgemeinen lagen die von uns angewandten Bebrütungsdauern zwischen 2 und 4 Tagen. Die anschließende „Hungerperiode" haben wir auf 12—14 Stunden ausgedehnt.

C. Nährboden. Wir haben unseren Pilzen ursprünglich, der Originalvorschrift entsprechend, technische *Glucose* als C-Quelle geboten. Da wir jedoch später fanden, daß mit dem *Rohrzucker* des Handels bei gleicher gewichtsmäßiger Mycel*ausbeute* deutlich (20—30 Proc.) höhere Mycel*aktivitäten* erreicht wurden, haben wir weiterhin ausschließlich dieses Nährsubstrat verwendet[1]).

[1]) Bernhauer (S. 121 a. a. O.) hat am *intakten* Aspergillus-mycel gleichfalls die überlegene Eignung der Saccharose für die Erzielung hoher Enzym-aktivitäten beobachtet und theoretische Erwägungen über ihre Ursachen angestellt.

II. Isolierung und Reinigung.

A. Isolierung durch Auspressen.

Die Untersuchungen wurden mit einer Bestimmung der beim ursprünglichen *Darstellungsverfahren von D. Müller* erzielbaren *Anreicherungsgrade* und *Enzymausbeuten* begonnen. Soweit in diesem und den folgenden Abschnitten nichts anderes angegeben ist, wurde durchweg mit *Asp. niger*, von dem mehrere Stämme zur Verfügung standen, gearbeitet.

Zunächst erfolgte, wie im vorausgehenden Abschnitt näher beschrieben, an einer zweckmäßig zerkleinerten Mycelprobe die Bestimmung der *Ausgangsaktivität* $Q^0_{O_2}$. (Zum Zerkleinern diente später eine Latapie-Mühle; die $Q^0_{O_2}$-Werte des Mycels lagen bei *Aspergillus* wie bei *Penicillium* im allgemeinen zwischen 5 und 15.) Das Produkt $Q_{O_2} \times$ mg Myceltrockengewicht stellt die Zahl der insgesamt eingesetzten *Enzym-Einheiten* (E.E.^{0}), also die *Ausgangs-enzymmenge* dar. Die gleichen Bestimmungen wurden mit dem nach Buchner dargestellten *Preßsaft* und dem daraus durch Alkohol–Ätherfällung in der üblichen Weise gewonnenen *Trockenpräparat* ausgeführt.

(Wenn im folgenden nichts besonderes vermerkt ist, beziehen sich die Q_{O_2}-Werte stets auf die Bedingungen des „Normalansatzes" (S. 125) ohne Abzug der „Leeratmung" des Enzymmaterials; nur wo letztere — ausnahmsweise — erheblichere Werte annahm, ist von diesem Verfahren abgegangen worden.)

Das Ergebnis eines derartigen an *Asp. niger* ausgeführten quantitativen Versuchs enthält Tab. 2. Die Quotienten $Q_{O_2}/Q^0_{O_2}$ und E.E./E.E.^{0} stellen den auf das Ausgangsmaterial bezogenen *Anreicherungsgrad* bzw. die *Enzymausbeute* dar.

Tabelle 2.

	Trockengewicht in mg	Q_{O_2}	$Q_{O_2}/Q^0_{O_2}$	E.E.	E.E./E.E.^{0}
Mycel	76000[1])	14	—	1062000	—
Preßsaft	5860[2])	16	1,14	93800	0,09
Trockenpräparat .	1360	25,8	1,84	35000	0,03

[1]) = 252 g in der Handpresse vom anhaftenden Wasser befreites Mycel. Die späteren Textangaben über Mycelgewichte beziehen sich stets auf derartiges — noch 60—70 Proc. bei 110° flüchtiges Wasser enthaltendes — Material.

[2]) = 92 ccm Flüssigkeit.

Wie man aus den Zahlen ersieht, ist das Originalverfahren Müllers außerordentlich verlustreich: kaum $^1/_{10}$ der Mycelaktivität wird in Lösung gebracht und auch hiervon erscheint nur $^1/_3$ in der Alkohol–Ätherfällung. Letztere ist knapp 2-mal aktiver als das Mycel.

In der 1. Mitteilung war bereits angegeben worden, daß sich durch 18-stündige *Dialyse* wiedergelöster Trockenpräparate eine etwa doppelte Anreicherung erzielen läßt. Um nicht die — offenbar verlustreiche — Alkohol–Ätherfällung ein zweites Mal wiederholen zu müssen, haben wir in einem Parallelversuch zu dem der Tab. 1 den Preßsaft *direkt* einer 40-stündigen Dialyse — die halbe Zeit gegen strömendes Leitungswasser (10°), die andere Hälfte gegen destilliertes Wasser im Eisschrank (3°) — unterworfen und anschließend wieder die Alkohol–Ätherfällung vorgenommen. Das Resultat ist in Tab. 3 zur Anschauung gebracht.

Tabelle 3.

	Trockengewicht in mg	Q_{O_2}	$Q_{O_2}/Q^0_{O_2}$	E.E.	E.E./E.E.°
Mycel	76000	14	—	1062000	—
Preßsaft, dialysiert	830	95	6,8	78800	0,07
Trockenpräparat .	316	84	6,0	30200	0,03

Die Enzym*ausbeuten* sind hier zwar ähnlich schlecht wie im vorausgehenden Versuch, doch ist das Endprodukt immerhin 6-mal reiner als das Ausgangsmaterial. Hauptbestreben mußte es daher sein, zunächst einmal mehr Enzym in Lösung zu bringen. Der erste — schon in der Arbeit von Franke und Lorenz angedeutete — Versuch dieser Art bestand darin, daß der Preßrückstand der ersten Behandlung noch wiederholte Male unter Wasser-, Quarz- und Kieselgur-Zusatz verrieben und ausgepreßt wurde.

So ergaben z. B. 450 g Pilzmycel nach 5-maligem Zusatz von je 90 ccm Wasser insgesamt rund 600 ccm Preßsaft, der nach 48-stündiger Dialyse gegen fließendes Leitungswasser in Portionen von 150 ccm mit Alkohol–Äther gefällt wurde. Enzymanreicherung und -ausbeute, die bei diesem Versuch jedoch nur im Endprodukt bestimmt wurden, zeigt Tab. 4.

Tabelle 4.

	Trockengewicht in mg	Q_{O_2}	$Q_{O_2}/Q^0_{O_2}$	E.E.	E.E./E.E.^{0}
Mycel	150000	7,2	—	1080000	—
Trockenpräparat .	2750	106	14,7	292000	0,27

Der Fortschritt, den diese — als „*verbessertes Preßverfahren*" bezeichnete — Methode gegenüber der ursprünglichen darstellt, ist unverkennbar: bei fast 15-facher Aktivitätssteigerung erscheint über $^1/_4$ der Mycelaktivität im Trockenpräparat. Trotzdem läßt das Verfahren in *praktischer* Beziehung noch sehr zu wünschen übrig: das wiederholte Verreiben des Mycelbreis mit Quarzsand und Kieselgur ist mühsam und zum mindesten sehr zeitraubend, auch wenn wir uns später die körperliche Arbeit durch Verwendung einer Syenitwalzenmühle erleichtert haben.

B. Isolierung durch Extraktion.

Es wurde daher untersucht, ob nicht durch *Extraktion* des in einfacherer Weise vorbehandelten Ausgangsmaterials eine Ablösung des Ferments von der Pilzzelle zu erreichen war. Dabei war — nach bekannten Erfahrungen der Enzymchemie — zu prüfen, ob nicht die Anwendung von *Pufferlösungen bestimmten p_H-Werts* Vorteile gegenüber der Extraktion mit Wasser böte.

a) *p_H-Einfluß.* Diesen haben wir, um zunächst nur *eine* Versuchsbedingung zu ändern, in einer nach dem *verbesserten Preßverfahren* (Versuch der Tab. 4) angestellten orientierenden Versuchsreihe untersucht.

Hierzu wurden gleiche Anteile trockengepreßten *Aspergillus-mycels* (20 g) mit ihrem Eigengewicht

1. H_2O 2. $^m/_{15}$-Na_2HPO_4
3. $^m/_{15}$-Na_2HPO_4 + KH_2PO_4 (1 : 2) 4. $^m/_{15}$-KH_2PO_4

in der dort angegebenen Weise verrieben und ausgepreßt. Das p_H der Preßsäfte war etwa

1. 6 2. 7,5 3. 6,3 4. 4,5.

In den 60 Stunden gegen Leitungswasser dialysierten und anschließend zentrifugierten Lösungen wurde die Enzymaktivität und -ausbeute ermittelt (Tab. 5).

Tabelle 5.

	Trockengewicht in mg	Q_{O_2}	$Q_{O_2} / Q^0_{O_2}$	E.E.	E.E./E.E.^{0}
Mycel	7550	12,8	—	96600	—
Preßsaft 1 (dialysiert)	232	95	7,4	22000	0,23
„ 2 (dialysiert)	230	102	8,0	23500	0,23
„ 3 (dialysiert)	163	110	8,6	17900	0,19
„ 4 (dialysiert)	165	58	4,5	9600	0,10

Der Einfluß des p_H auf die Enzym*aktivität* in Lösung ist nach Tab. 5 in der Nähe des Neutralpunkts ersichtlich gering, desgleichen allgemein der Unterschied zwischen reinem Wasser und Pufferlösungen. In stärker *saurer* Lösung wird indes die Aktivität erheblich kleiner. Größer und schon bald unterhalb des Neutralpunkts erkenntlich ist die nachteilige Wirkung sauren Reaktionsmilieus auf die Enzym*ausbeute.*

Es ist sehr unwahrscheinlich, daß die vergleichsweise geringe Aktivität und Ausbeute im Ansatz bei p_H 4,5 auf eine *Fermentschädigung* zurückgeht. Denn in „Normalversuchen" bei p_H 6,8, in denen Ferment, das $2^1/_2$ Stunden unter Zimmertemperatur bei p_H-Werten zwischen 7,5 und 3,0 gehalten worden war, eingesetzt wurde, waren die O_2-Aufnahmen innerhalb der Fehlergrenze dieselben. (Allenfalls war bei p_H 8,6 unter diesen Bedingungen eine geringe Aktivitätsminderung — 12 Proc. — festzustellen.) Viel wahrscheinlicher ist, daß das *Fermenteiweiß* in sauren Lösungen *unlöslicher* ist als in neutralen.

Wir haben später, um von wechselndem Säuregehalt und Puffervermögen des Pilzmycels unabhängig zu sein, der Extraktion mit Wasser fast stets diejenige mit $^m/_{15}$—$^m/_{30}$-Na_2HPO_4-lösung vorgezogen.

b) *Einfluß der Mycelaufbereitung.* Folgende Extraktionsversuche wurden an gleichen Mycelportionen nach 3-maligem Durchtreiben durch die Fleischmaschine ausgeführt:

1. Direkte Extraktion,
2. Extraktion in der Kugelmühle,
3. Extraktion nach dem Frieren mit flüssiger Luft,
4. Extraktion nach dem Verreiben mit Quarzsand und Kieselgur.

Es wurden jeweils 65 g Mycel verwendet, die mit der 4-fachen Menge $^m/_{15}$-Na_2HPO_4 3 Stunden lang ausgezogen wurden. Dann wurde abzentrifugiert, das p_H der Lösung bestimmt — es lag in allen Fällen

zwischen 7,1 und 7,3 —, anschließend 40 Stunden in der üblichen Weise dialysiert und zuletzt Trockengewichts- und Aktivitätsbestimmung vorgenommen. Das Ergebnis enthält Tab. 6.

Tabelle 6.

Extrakt	ccm	Trocken-gewicht in mg	Q_{O_2}	E.E.
1	306	922	201	185000
2	305	968	196	190000
3	335	805	217	175000
4	340	772	234	180000

Das Resultat war für uns ebenso überraschend wie erfreulich: die einfache Vorbehandlung des Mycels in der Fleischmaschine ersetzt sowohl das bisher geübte mühsame und zeitraubende Verreiben mit Quarzsand und Kieselgur als auch die Anwendung der Kugelmühle oder die Behandlung mit flüssiger Luft, letzteres zwei Verfahren, die sich neuerdings bei der Abtrennung von an sich schwerisolierbaren Desmolasen aus Moosen[1]) bzw. aus Hefe[2]) gut bewährt haben. Die Enzym*ausbeute* ist jedenfalls in allen Fällen die gleiche, der *Aktivitäts*unterschied zugunsten der komplizierteren Verfahren, wenn überhaupt reproduzierbar, so gering, daß er den erheblichen Mehraufwand an Arbeit in keiner Weise lohnt.

Der prozentische Anteil an Mycelaktivität, der bei diesen Extraktionen in Lösung gegangen war, ist versehentlich nicht bestimmt worden. Dies wurde bei anderer Gelegenheit nachgeholt in einem Versuch, der in Tab. 7 zur Anschauung gebracht ist und der zeigt, daß rund *die Hälfte* der Ausgangsenzymmenge sich im Extrakt wiederfindet.

Tabelle 7.

	Trockengew. in mg	Q_{O_2}	$Q_{O_2} / Q^0_{O_2}$	E.E.	E.E./E.E.^{0}
Mycel (75 g) . . .	24000	9,0	—	216000	—
Extrakt, dialysiert (350 ccm) . . .	1740	66,4	7,4	115200	0,53

Später haben wir das Extraktionsverfahren noch weiter verbessert dadurch, daß wir den Mycelbrei zuerst mit der *3-fachen* Wasser- bzw. Phosphatmenge und nach dem Zentrifugieren nochmals mit dem *doppelten* Flüssigkeitsvolumen unter jeweils *mehrstündigem* Schütteln ausgezogen. (Setzt man — zur Vermeidung gröberer Infektionen — etwas

[1]) W. Franke u. Hasse, H. **249**, 231 (1937).
[2]) F. Lynen, A. **539**, 1 (1939).

Octylalkohol zu, so kann — unter deutlicher weiterer Erhöhung der Enzymausbeute, wahrscheinlich durch Autolyse — auch *über Nacht* geschüttelt werden.) Die zweiten Extrakte ergeben im Durchschnitt nochmals die Hälfte der in den ersten enthaltenen Enzymmenge, so daß wir in beiden Operationen zusammen Enzymausbeuten von 75 bis 80 Proc., manchmal auch noch darüber, erzielen konnten.

Auf eine 3. Extraktion, die wahrscheinlich zu einer insgesamt fast quantitativen Fermentablösung geführt hätte, haben wir im Interesse der Volumbeschränkung verzichtet.

Es sei noch angefügt, daß von der ursprünglichen Extraktaktivität ein kleiner Teil — meist zwischen 10 und 20 Proc. — bei der 2—3-tägigen Dialyse gegen stömendes Leitungswasser verlorengeht. Wahrscheinlich ließe sich der Verlust durch Herabsetzung von Dialysendauer und -temperatur (z. B. im Schnelldialysator und Eisschrank) verringern.

C. Anreicherung durch Eindampfen.

Eine anfängliche Schwierigkeit unserer Extraktionsmethode lag in der weiteren Verarbeitung des anfallenden großen Flüssigkeitsvolumens, das in den präparativen Normalchargen von etwa 500 g Mycel in der Nähe von 3 Litern lag. Die bisher geübte Fällung mit dem 12-fachen Volumen Alkohol-Äthergemisch (2:1) verbot sich schon wegen des jetzt enormen Verbrauchs an den organischen Lösungsmitteln und schien zudem nach früheren Erfahrungen (Tab. 2 und 3) gerade bei verdünnten Enzymlösungen recht verlustreich zu sein. Wir haben daher versuchsweise unsere dialysierten Extrakte i. V. bei 20—30° auf etwa $^1/_{10}$ ihres ursprünglichen Volumens eingeengt und erst dann die Alkohol-Ätherfällung vorgenommen. Wir waren, da das Eindampfen pro Liter Extrakt ungefähr 1 Stunde dauerte und dabei erhebliche schmutzigbraune Niederschläge auftraten, die wir vor der Endfällung abzentrifugierten, auf größere Enzymverluste gefaßt. Zu unserem Erstaunen hielten sich diese innerhalb der bescheidenen Grenzen von 10—20 Proc., wie sie schon bei der vorausgehenden Dialyse aufgetreten waren; die Enzym*aktivität* jedoch hatte bei der Behandlung nicht nur keine Einbuße, sondern einen Anstieg auf etwa das $1^1/_2$—2-fache erfahren.

Nachstehend wird das Ergebnis eines orientierenden Doppelversuchs wiedergegeben, in dem je 100 ccm eines dialysierten

Preßsafts nach dem Eindampfen auf 10 ccm und Zentrifugieren 1. mit Alkohohol-Äther gefällt wurden, 2. im Vakuumexsiccator vollends zur Trockne eingedunstet wurden. ($Q^0_{O_2}$ und E.E.^{0} beziehen sich hier und im folgenden auf die *jeweilige Ausgangsstufe.*)

Tabelle 8.

	Trocken-gewicht in mg	Q_{O_2}	$Q_{O_2} / Q^0_{O_2}$	E.E.	E.E./E.E.^{0}
Extrakt, dialysiert (100 ccm)	1125	56	—	58000	—
Trockenpräparat (1) .	483	103,5	1,85	50000	0,86
Eindampfrückstand (2)	607	89	1,6	54000	0,93

Wie man sieht, wäre es durchaus möglich, die Alkohol-Ätherfällung durch einfaches Eindunsten zur Trockne zu ersetzen. Wir haben das erstere Verfahren trotzdem beibehalten, weil 1. rasches Eindunsten größerer Volumina im Vakuumexsiccator auf Schwierigkeiten stößt, 2. die Aktivität der Alkohol-Ätherfällung deutlich größer ist als die des Eindampfrückstands, 3. letzterer durch den bei der Extraktion in Lösung gegangenen Sporenfarbstoff *Asperqillin*[1]) braun gefärbt ist, während bei der Alkohol-Ätherfällung weiße bis weißgraue Präparate erhalten werden.

Wir haben, nachdem wir uns von der Unschädlichkeit und Zweckmäßigkeit der Eindampfoperation überzeugt hatten, diese weiterhin stets beibehalten und sind dabei teilweise auf noch wesentlich kleinere Volumina, z. B. $^1/_{50}$ des ursprünglichen, heruntergegangen. Das Ergebnis war stets das gleiche: beim Eindampfen fallen $^1/_3$ bis fast $^2/_3$ des Trockengewichts in Form eines wenig aktiven, wesentlich aus hochmolekularen Verunreinigungen bestehenden Niederschlags aus, während sich aus dem Zentrifugat durch Alkohol-Ätherfällung ein weiteres Drittel oder darüber in weitgehend angereichertem Zustande erhalten ließ.

So standen in einem derartigen Versuch die *Gewichte* von Eindampfniederschlag und Alkohol-Ätherpräparat im Verhältnis 1 : 1, die *Aktivitäten* sowohl wie die *Enzymmengen* im Verhältnis 1 : 6,7, d. h. nur 13 Proc. der gefällten Gesamtaktivität gingen in die „Vorfällung". Diese wurde — schon in Anbetracht ihrer mangelhaften Löslichkeit — in unseren Versuchen nicht weiter berücksichtigt.

[1]) A. Quilico u. di Capua, R. A. L. **17**, 93 (1933).

Wir sind bei zunehmender Erfahrung zu dem Schluß gekommen, daß die *Temperatursteigerung* der aktivitätserhöhende Faktor beim Eindampfvorgang ist. Wir haben daher die Innentemperatur bei der Destillation auf 30—35° erhöht, haben aber andrerseits Randüberhitzungen durch zu hohen Stand der Badflüssigkeit von 55—60° peinlich zu vermeiden gesucht. Unter diesen Bedingungen haben wir ziemlich regelmäßig Aktivitätssteigerungen auf etwa das *Dreifache* erhalten, wie dies der folgende Versuch belegt, der zugleich zeigt, daß *zu weitgehendes* Eindampfen (z. B. auf $^1/_{80}$) zu Aktivitätsverlusten führt.

Tabelle 9.

Extrakt	Trockengewicht in mg	Q_{O_2}	$Q_{O_2} / Q^0_{O_2}$	E.E.	E.E./E.E.°
Dialysiert (960 ccm) .	2070	194	—	401000	—
Eingedampft auf 62 ccm (= $^1/_{15}$) . .	610	610	3,1	373000	0,93
Eingedampft auf 12 ccm (= $^1/_{80}$) . .	562	472	2,4	265000	0,66

In einem anderen Versuch wurde im Anschluß an das normale Eindampfen noch kurze Zeit auf Temperaturen von 60 bzw. 65° erhitzt und hierbei eine nochmalige, fast verlustfreie Aktivitätssteigerung um ungefähr $^1/_3$ erzielt (Tab. 10).

Tabelle 10.

Extrakt	Trockengewicht in mg	Q_{O_2}	$Q_{O_2} / Q^0_{O_2}$	E.E.	E.E./E.E.°
Dialysiert (1720 ccm) .	9100	210	—	1900000	—
Eingedampft auf 350 ccm (= $^1/_{13}$) . .	2360	643	3,1	1520000	0,80
350 ccm, 10 Min. erhitzt auf 60° . . .	2010	732	3,5	1470000	0,78
350 ccm, 5 Min. erhitzt auf 65°	1660	874	4,2	1450000	0,76

D. Fällung durch organische Lösungsmittel.

a) *Alkohol-Äther.* Das einfachste und von uns lange Zeit fast ausschließlich geübte Verfahren zur Gewinnung fester Fermentpräparate

aus Lösungen war die Fällung der letzteren mit dem 12-fachen Volumen eines Alkohol–Äthergemisches (2 : 1). Die Operation bringt, wenn sie auf *konzentrierte* Enzymlösungen angewandt und *rasch* — unter Benützung der Zentrifuge — ausgeführt wird, nur geringe Enzymverluste (etwa 10—15 Proc.) mit sich, die *Aktivität* der Trockenpräparate ist — mit einer Variation von ± 10 Proc. — die gleiche wie die des gelösten und dialysierten Enzyms.

b) *Aceton.* Bisweilen haben wir an Stelle der Alkohol–Äthermischung mit gleichem Erfolg *Aceton* verwendet, von dem bekannt ist, daß es ein für höher empfindliche Enzyme [z. B. Ascorbino-oxydase[1])] schonenderes Fällungsmittel ist als Alkohol–Äther. Geringe Enzymverluste traten auch hier auf, doch schien die Aktivität der Fällungen ziemlich regelmäßig gegenüber der der Lösungen etwas erhöht.

Wir haben uns gefragt, ob — zum wenigsten bei konz. Enzymlösungen — der große Überschuß des organischen Solvens notwendig ist und ob sich nicht durch *geringere*, eventuell *fraktioniert* erfolgende Zusätze desselben Enzymanreicherung bzw. Abtrennung von Verunreinigungen erzielen ließe.

Um nicht unseren geringen Vorrat an dem nach *C.* gereinigten Ferment, für dessen weitere Anreicherung das Verfahren vorwiegend in Aussicht genommen war, aufs Spiel zu setzen, haben wir zunächst einen orientierenden Versuch mit einem roheren Enzym (Q_{O_2} = 80,6), wie es etwa in den Ansätzen der Tab. 3 und 4 gewonnen worden war, und zwar absichtlich in ziemlich konz. Lösung (100 mg in 5 ccm) angestellt.

Tabelle 11.

Aceton / Wasser	Trockengewicht in mg	Q_{O_2}	Q_{O_2}/Q_{O_2}	E.E	E.E./E.E.^{0}
		a) *Stammlösung*			
0	100	80,6	—	8060	—
		b) *Totalfällungen*			
0,5	14	82,9	1,03	1160	0,14
1	36	165	1,61	5950	0,74
2	74,5	99,5	1,23	7410	0,92
5	78	87,8	1,09	6850	0,85
		c) *Fraktionierung*			
0 — 0,5	14	82,9	1,03	1160	0,14
0,5 — 0,75	12 } 39	372 } 160[2])	4,62 } 1,98[2])	4470 } 6260	0,55 } 0,78
0,75 — 1	13	50	0,62	650	0,08

[1]) M. Srinivasan, Biochemic. J. **30**, 2077 (1936).

[2]) Diese Werte sind *indirekt* (aus E.E./mg Trockengewicht) rückberechnet worden.

Die Zugabe des *Acetons* erfolgte *unter Eiskühlung* bis zu dem in der Tab. 11 verzeichneten Volumverhältnis. Die Niederschläge wurden möglichst rasch abzentrifugiert und im Vakuumexsiccator über H_2SO_4 getrocknet.

Wie man aus der Tabelle erkennt, ist von den „Totalfällungen" (b) diejenige mit dem gleichen Volumen Aceton die für die Reinigung vorteilhafteste, da sie rund $^3/_4$ der eingesetzten Enzymmenge in $1^1/_2$—2-fach angereicherter Form erfassen läßt. Führt man sie fraktioniert (c) durch, so gelingt es, in einer Mittelfraktion mit über 50-proc. Ausbeute sogar eine $4^1/_2$-fache Anreicherung zu erzielen.

Die günstigen Erfahrungen des Vorversuchs an Rohenzym (Q_{O_2} etwa 80) ließen uns das Verfahren der *fraktionierten Acetonfällung* auch auf die durch Dialyse und Eindampfen nach C. gewonnenen reineren Präparate (Q_{O_2} etwa 500) anwenden. Das Ergebnis war im Prinzip das gleiche: In einer Mittelfraktion, in welcher der Acetongehalt der Lösung vom 0,4- aufs 0,8-fache gesteigert wird, fällt die Hälfte bis $^2/_3$ des Ferments mit einem Anreicherungsquotienten von 2 bis fast 4 aus (Tabb. 12 u. 13).

Wir haben den Anreicherungsgrad in dieser Stufe noch nicht ganz sicher in der Hand. Es scheint, daß die Acetonfraktionierung um so effektiver ist, je weiter vorher eingedampft worden war, was aber nach S. 134 wiederum wegen der Verluste nicht unbegrenzt durchführbar ist. Vgl. hierzu den Fällungsversuch der Tab. 13, der unmittelbar im Anschluß an das im Versuch der Tab. 9 durchgeführte starke Einengen (auf $^1/_{80}$) angestellt wurde. Hingegen kam im Versuch 12[1]) eine in normaler Weise vorbehandelte Enzymlösung (eingedampft auf $^1/_{15}$) zur Anwendung.

Tabelle 12.

Aceton / Wasser	Trockengewicht in mg		Q_{O_2}		$Q_{O_2}/Q^0_{O_2}$		E.E.		E.E./E.E.^{0}	
0	1300 in 20 ccm		521,5		—		680000		—	
0—0,2	92		232		0,45		21300		0,03	
0,2—0,4	91		448		0,86		40800		0,06	
0,4—0,6	128	935	1120	633	2,15	1,21	143500	591000	0,21	0,86
0,6—0,8	314		962,5		1,85		302000		0,44	
0,8—1,5	310		272		0,52		84300		0,12	
Anreicherungsfraktion										
0,4—0,8	442		1010		1,94		445500		0,66	

[1]) Diese abgekürzte Bezeichnungsweise wird weiterhin für den Versuch der entsprechend numerierten Tabelle verwendet.

Tabelle 13.

Aceton / Wasser	Trockengewicht in mg	Q_{O_2}	$Q_{O_2}/Q^0_{O_2}$	E.E.	E.E./E.E.^{0}
0	562 (in 16 ccm)	472	—	265000	—
0—0,45	140 } 219	573 } 975	1,21 } 2,06	80500 } 214500	0,30 } 0,81
0,45—0,8	79 }	1700 }	3,6 }	134000 }	0,51 }

c) *Dioxan. Fraktionierte Dioxanfällung*, die bei der Katalase unlängst zu krystallisierten Präparaten geführt hat[1]), hat sich in unserem Fall, soweit ein orientierender Versuch ein Urteil erlaubt, als *ungeeignet* erwiesen. Wir arbeiteten unter ganz ähnlichen Bedingungen wie im Versuch 11c, mit den Dioxan/Wasser-Verhältnissen 0,6, 1,0 und 1,5. Bei einem Enzymeinsatz von 11700 E.E. ($Q_{O_2} = 78$) waren die Q_{O_2}-Werte der 3 Fraktionen 6,7, 61,2 und 10,0, die E.E.-Werte 90, 1040 und 280. Nur 12 Proc. der eingesetzten Enzymmenge wurden in den Fällungen wiedergewonnen, in keinem Falle erreichte deren Aktivität auch nur die des Ausgangsmaterials. Möglicherweise hängt der Aktivitätsverlust mit dem langsamen Abdunsten des ziemlich schwerflüchtigen Lösungsmittels zusammen.

E. Adsorption und Elution.

Ähnliche Anreicherungseffekte wie durch die fraktionierte Acetonfällung haben wir bei Präparaten der Reinheitsstufe C ($Q_{O_2} \geqq 500$) auch mit Hilfe des *Adsorptionsverfahrens* nach Willstätter[2]) erreicht. Wir haben allerdings nur 2 Versuche dieser Art, und zwar mit *Kaolin* und *Tonerde* C_γ ausgeführt. Letztere erwies sich als das weitaus geeignetere Adsorbens für das Enzym, doch scheint sich Kaolin für eine *Vor-adsorption* von Begleitstoffen zu eignen. Tab. 14 verzeichnet Bedingungen und Ergebnis des *Tonerde-Versuchs*.

Beim Vergleich mit Tab. 13 zeigt sich eine auffallende Übereinstimmung: in beiden Fällen gelingt es mit einer Ausbeute von 40—50 Proc. ein 3—3½-mal reineres Ferment zu erhalten. Da jedoch die Acetonfraktionierung — vor allem wegen des Fortfalls der Dialyse — *rascher* zum Ziel führt und zudem ein *festes* Dauerpräparat liefert, haben wir uns weiterhin ausschließlich ihrer bedient; es ist jedoch durchaus

[1]) J. B. Sumner u. Dounce, J. biol. Chem. **121**, 417 (1937); **127**, 439 (1939).

[2]) Zur Methodik vgl. H. Kraut bei Oppenheimer-Pincussen, D. Methodik d. Fermente, S. 445 (Leipzig 1929).

möglich, daß in späteren Reinigungsphasen, wo u. U. die Acetonfällung versagt (vgl. S. 140), das Adsorptionsverfahren die geeignetere Methode ist.

Tabelle 14.

	Trockengewicht in mg	Q_{O_2}	$Q_{O_2}/Q^0_{O_2}$	E.E.	E.E./E.E.^{0}
100 mg Enzym gelöst in 40 ccm $^m/_{20}$-Acetatpuffer (p_H 4,7):					
Ausgangs-enzymlösung	100	533	—	53300	—
2,5 ccm 3-proc. Tonerde-suspension zugesetzt und 15 Minuten stehen gelassen:					
Adsorbat . . .	—	—	—	43400	0,81 (1,00)
Restlösung . .	—	—	—	9900	0,19
Adsorbat mit 10 ccm $^m/_{15}$-Na_2HPO_4 20 Minuten eluiert (1); Adsorbat nochmals mit 10 ccm $^m/_{15}$-Na_2HPO_4 40 Minuten eluiert (2):					
Eluat 1 . . .	—	—	—	21900	26800	0,51 (0,62)[1]
Eluat 2 . . .	—	—	—	4900		
Vereinigte Eluate 40 Stunden bei 10° dialysiert:					
End-enzym-lösung . . .	12	1750	3,3	21000	0,40 (0,49)[1]

Bei Verwendung von *Kaolin* (nach Willstätter und Schneider) ließ sich zwar unter den obigen p_H-Bedingungen die *Adsorption* ohne Schwierigkeit durchführen (obwohl dabei größere Mengen des Adsorbens notwendig waren), doch trat bei der *Elution* — trotz mehrfacher Wiederholung — nur etwa $^1/_3$ der adsorbierten Fermentmenge wieder in Lösung auf.

Hingegen lieferte eine *Vor-adsorption bei neutraler Reaktion* (p_H 7,3) eine um rund 25 Proc. angereicherte Restlösung.

F. Fällung mit Ammonsulfat.

Die Ammonsulfatfällung ist neuerdings insbesondere von Warburg und seiner Schule zur Reinigung von Fermentproteinen[2]) [auch bei „gelben Fermenten"[3])] in systematischer Weise herangezogen worden. Auch wir haben ihre Wirk-

[1]) Die eingeklammerten Ausbeute-zahlen beziehen sich auf die *adsorbierte* Enzymmenge als Einheit; wir haben die Adsorption — dem üblichen Verfahren folgend — absichtlich nicht bis zur Vollständigkeit durchgeführt.

[2]) Lit. bei O. Warburg, Erg. Enzymforsch. 7, 210 (1938).

[3]) Vgl. Literaturangaben S. 119 sowie zu Tab. 18, S. 149.

samkeit sowohl an Rohpräparaten ($Q_{O_2} \sim 100$) als auch an reineren ($Q_{O_2} > 1000$) erprobt und haben dabei, schon ohne Fraktionierung, in beiden Fällen Aktivitätssteigerungen auf das 2—$2^1/_2$-fache beobachtet, in befriedigender Ausbeute allerdings erst bei hohen Sättigungsgraden ($> 0{,}8$-fach). Wir haben die Methode bei den Rohpräparaten nicht weiter ausgebaut, da uns seinerzeit noch wirksamere und rascher ausführbare Verfahren zur Verfügung standen, sind aber im Anschluß an letztere gegen Ende dieser Untersuchung darauf zurückgekommen und halten sie — neben der Adsorption — für die aussichtsreichste Operation der weiteren Fermentreinigung.

a) Die Verhältnisse bei der Fällung eines *Rohenzyms* ($Q_{O_2} = 98$) gibt Tab. 15 wieder. Es wurden stets 100 mg Enzym (= 9800 E.E.) in 4 ccm Wasser gelöst und unter Eiskühlung Ammonsulfatlösung bestimmten Sättigungsgrads (evtl. festes Ammonsulfat) bis zum Gesamtvolumen von 20 ccm zugegeben. Nach raschem Zentrifugieren wurde die wieder in Wasser gelöste Fällung 2 Tage, das Zentrifugat 3 Tage, gegen fließendes Leitungswasser dialysiert.

Tabelle 15.

Sättigungsgrad d. Gesamtlösung		Trockengewicht in mg		Q_{O_2}	$Q_{O_2}/Q^0_{O_2}$	E.E.		E.E./E.E.^{0}	
0		100		98	—	9800		—	
0,33	Fällung .	Trübung		—	—	—		—	
	Lösung .	—		—	—	—		—	
0,5	Fällung .	8,6	78,6	80	0,82	690	8740	0,07	0,89
	Lösung .	70		115	1,17	8050		0,82	
0,7	Fällung .	16,4	78,9	175	1,79	2870	8870	0,29	0,90
	Lösung .	62,5		96	0,98	6000		0,61	
0,8	Fällung .	26	79	186	1,90	4850	7660	0,50	0,79
	Lösung .	53		55	0,56	2810		0,29	

Die Versuche sind, vor allem wegen der kleinen eingesetzten Enzymmengen, sicherlich nicht sehr genau; im besonderen glauben wir nicht, daß dem Enzymverlust im letzten Ansatz eine reale Bedeutung zukommt.

b) Für den Versuch mit *reinerem Enzym* diente das Produkt einer fraktionierten Acetonfällung mit einem Q_{O_2} von 1215. 238 mg wurden in 10 ccm Wasser gelöst und bei 0° mit festem Ammonsulfat bis zum Sättigungsgrad 0,9 versetzt. Die Fällung wird in wenig Wasser aufgenommen und im Eisschrank 36 Stunden gegen destilliertes Wasser

dialysiert. Das Ergebnis dieses Versuchs, bei dem eines unserer bisher reinsten Präparate erhalten wurde, zeigt Tab. 16.

Tabelle 16.

	Trockengewicht in mg	Q_{O_2}	$Q_{O_2} / Q^0_{O_2}$	E.E.	E.E./E.E.^{0}
Ausgangslösung . . .	238	1215	—	290000	—
Ammonsulfatfällung .	100	2700	2,22	270000	0,93

Wie ersichtlich, gelingt bei vorgereinigtem Ferment durch einfache Ammonsulfatfällung eine fast verlustfreie Anreicherung auf über das Doppelte. Wahrscheinlich ließe sich der Effekt durch Einschaltung einer Vorfällung noch erhöhen.

Eine unerwartete Erscheinung trat auf, als wir aus der dialysierten Lösung des obigen Ammonsulfatniederschlags durch fraktionierte Acetonfällung (nach D, b) ein Trockenpräparat herzustellen versuchten. $^2/_3$ der Enzymmenge gingen dabei verloren und das erhaltene Produkt zeigte nur mehr einen Q_{O_2}-Wert von $\sim$ 1000. Wir nehmen an, daß in diesem Reinheitsstadium durch die Acetonbehandlung eine teilweise *Spaltung* des Ferments in Protein und prosthetische Gruppe bewirkt wird. Diese Erklärung stünde im Einklang mit Beobachtungen am „alten" Flavinferment von Warburg und Christian[1]).

Womöglich ist es von hier ab zweckmäßig bzw. notwendig, die Reinigung der beiden Teilstücke nach absichtlicher Spaltung *getrennt* fortzuführen, ähnlich wie dies Warburg und Negelein (a. a. O., S. 119) bei der Aminosäure-oxydase getan haben.

III. Einige Eigenschaften des gereinigten Enzyms.

Systematische Untersuchungen über das enzymchemische Verhalten der Glucose-oxydase im heutigen Reinheitszustand haben wir nicht angestellt, da derartige Untersuchungen zweckmäßigerweise erst nach erfolgter *Reindarstellung* des Ferments vorgenommen werden. Wir teilen heute nur das Ergebnis einiger Versuche mit, die z. T. noch in die 1. Mitteilung gehört hätten, z. T. auf Unterschiede in den Eigenschaften von rohem und gereinigtem Enzym hinweisen.

A. O_2-Aufnahme und H_2O_2-Bildung.

Wie schon früher (S. 120) erwähnt, sind die Bedingungen unserer Testversuche nicht optimal. Verwenden wir statt

[1]) H. Theorell, a. a. O., S. 121.

des „Normalansatzes“ (S. 125) den „Optimalansatz“, so steigen die Q_{O_2}-Werte aufs $2^1/_2$—3-fache und erreichen für unsere besten Präparate (z. B. des Versuchs 15) rund 8000. Die „Eigenatmung“ solcher Präparate ist minimal und liegt bei 1 Proc. der Glucoseatmung und darunter.

Der „Optimalansatz“, der stets bei 30° und unter reinem O_2 läuft, hat folgende Zusammensetzung:

1 ccm Enzymlösung
2 ccm $^m/_5$-Phosphatpuffer (p_H 6,0)
2 ccm 2 m-Glucose.

Franke u. Lorenz konnten seinerzeit bei Verwendung ihrer *Rohenzym*-präparate (Q_{O_2} 20—40) das bei der aeroben Funktion der Glucose-oxydase auftretende *Hydroperoxyd* nur nach Vergiftung der gleichzeitig vorhandenen Katalase (z. B. mit H_2S, NaN_3, NH_2OH u. dergl.) nachweisen. Bei unseren *gereinigten* Präparaten gelingt dieser Nachweis mühelos — besonders unter den Bedingungen des „Optimalansatzes“ — schon *ohne* Vergiftung, allerdings auch hier noch bei weitem nicht quantitativ.

Es wurden zwei Versuche nebeneinander ausgeführt, 1. mit 1,5 mg Enzym vom (Normal-) Q_{O_2}-Wert 830, 2. mit 0,5 mg vom Q_{O_2}-Wert 2500. Nach 60 Minuten waren in beiden Fällen rund 3800 cmm O_2 aufgenommen. Hiervon wurden jodometrisch als H_2O_2 erfaßt

in 1. 4,1 Proc., in 2. 7,1 Proc. der theoretisch maximalen Ausbeute.

B. Acceptor-spezifität.

Bei *Rohenzym* war es nicht geglückt, den Sauerstoff durch andere Acceptoren als *Chinon* und *Indophenole* zu ersetzen. Bei *gereinigtem* Enzym ist die Auswahl der Acceptoren erheblich größer, sie umfaßt außer verschiedenen *Redoxindicatoren* u. a. auch *Cytochrom c.*

a) Chinoide Farbstoffe. Thunberg-Versuche liefen bei 30° mit folgendem Ansatz:

0,5 ccm Enzymlösung (= 5 mg, Q_{O_2} = 830)
0,5 ccm $^m/_5$-Phosphatpuffer (p_H 6,8)
1 ccm $^m/_{1000}$-Farbstofflösung
1 ccm H_2O bzw. $^m/_1$-Glucose.

In der folgenden Tabelle sind die Entfärbungszeiten der Substratansätze nebst den „Normalpotentialen“ der einzelnen Farbstoffe

bei p_H 7 zusammengestellt. Die Kontrollen ohne Substratzusatz waren auch nach 24 Stunden noch nicht entfärbt.

Tabelle 17.

Farbstoff	E'_0	Entfärbungszeit (in Minuten)
Toluylenblau. . .	0,115	11
Thionin	0,062	16
Methylenblau. . .	0,011	75
Pyocyanin	−0,034	31
Safranin T	−0,289	>1400

Die Entfärbungszeiten folgen im großen ganzen den Redoxpotentialen. (Die trotz tieferen Potentials überlegene Reduktionsgeschwindigkeit des *Pyocyanins* gegenüber dem Methylenblau kehrt in verschiedenen anderen enzymatischen Systemen wieder[1]) und hängt höchstwahrscheinlich mit der *einstufigen Hydrierung* [*Semichinonbildung*[2])] dieses Farbstoffes zusammen.

Die Frage, warum bei höherer Fermentkonzentration — sie ist im vorliegenden Fall etwa 30 mal größer als in den alten Versuchen von Franke u. Lorenz — Acceptoreffekte auftreten, die bei schwächeren Enzymlösungen nicht zu beobachten waren, findet eine befriedigende Beantwortung in dem Hinweis auf bekannte Eigenheiten der Thunberg-Methodik: in den früher negativ verlaufenen Versuchen waren die Zeiten, die zur Entfärbung notwendig gewesen wären, so groß, daß in ihnen — vermutlich unter der Wirkung des Farbstoffs — *Ferment-inaktivierung* eingetreten war.

Die erweiterte Acceptor-spezifität kehrt übrigens bei der *tierischen* Glucose-oxydase wieder, die im Pharynxdrüsensekret der Biene in beachtlich hoher Aktivität — Q_{O_2} über 200 — vorkommt. (S. 124.)

b) Cytochrom c. Eine 5 ccm-Kuvette von 1 cm Durchmesser wurde vollständig mit einem Ansatz folgender Zusammensetzung:

[1]) Lit. hierzu bei Oppenheimer, D. Fermente und ihre Wirkungen, Suppl. S. 1145. (Den Haag 1938).

[2]) Vgl. z. B. L. Michaelis, Oxydations-Reduktionspotentiale (Berlin 1933); Chem. Rev. **16**, 243 (1935).

1 ccm Enzymlösung (= 5 mg, Q_{O_2} = 830)
1 ccm $^{m}/_{5}$-Phosphatpuffer (p_H 6,8)
2,5 ccm Cytochrom c-lösung (oxydiert, 0,14-proc.[1])
0,5 ccm 2 m-Glucose

gefüllt und durch eine Deckplatte luftdicht verschlossen. Analog angesetzte Kontrollen ohne Enzym bzw. ohne Glucose liefen nebenher. Versuchstemperatur 25°. Nach verschieden langen Zeiten wurde im Strahlengang einer Zeiss-Punktlichtlampe auf das Auftreten der Linien des reduzierten Cytochroms (550 und 520 mμ) geprüft, wobei ein Steinheil-Spektrograph zur Anwendung kam. Testlösungen bestimmten Gehalts an (mit $Na_2S_2O_4$) reduziertem Cytochrom dienten zum Vergleich. Das Ergebnis des Hauptversuchs war, daß

nach $3^1/_2$ Stunden 20 Proc. Reduktion,
„ $5^1/_2$ „ 30 „ „
„ $7^1/_2$ „ 40 „ „

erfolgt war; in den beiden Kontrollen zeigten sich auch nach 24 Stunden noch keine Anzeichen beginnender Reduktion.

Das Acceptorvermögen des Cytochroms c im System der Glucose-oxydase steht demnach einwandfrei fest, ist aber quantitativ nur sehr schwach entwickelt. Die Erscheinung als solche ist *enzymtypisch* interessant, doch *physiologisch* wegen der enormen kinetischen Überlegenheit der *direkten* O_2-Reaktion sicher bedeutungslos; dies um so mehr, als auch die Bedeutung des Cytochromsystems selbst für die Schimmelpilzatmung keineswegs generell erwiesen ist.[2])

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der definitorische Wert der „betonten oder ausschließlichen Acceptor-spezifität zum molekularen Sauerstoff" (Oppenheimer 1937) für die Gruppe der *Oxhydrasen* oder *Aero-dehydrasen* eine zunehmende Einschränkung erfährt. *Wesentlich* ist nur die Fähigkeit zur *direkten Reaktion mit* O_2 (im Gegensatz zu den Anaero-dehydrasen); was die Oxhydrasen darüber hinaus noch in bezug auf Acceptorverwertung vermögen, ist — zum mindesten definitionsmäßig — belanglos.

---

[1]) Die Cytochromlösung war nach D. Keilin u. Hartree (Proc. Roy. Soc. [B] **122**, 298 (1937) dargestellt; die Konzentrationsbestimmung erfolgte stufenphotometrisch nach A. Fujita und Mitarbeitern, Bio. Z. **301**, 377 (1939).

[2]) Vgl. hierzu H. Tamiya u. Hida, Acta phytochim. **4**, 215, 343 (1929). — W. Frei, Riedmüller u. Almasy, Bio. Z. **274**, 253 (1934).

Wohl reagiert in den vorerwähnten Beispielen die Glucose-oxydase mit den *Farbstoffen* um 2—3 Größenordnungen langsamer als mit O_2; andrerseits erweist sich *Chinon* schon beim *rohen* Enzym von Franke u. Lorenz als ein dem O_2 kinetisch ebenbürtiger, wenn nicht überlegener Acceptor.

Die Glucose-oxydase steht in der Acceptor-spezifität zwischen dem acceptor-*unspezifischen* Schardinger-Enzym und den ziemlich streng bis absolut acceptor-*spezifischen* Oxhydrasen vom Typus der Aminosäure-oxydase oder Oxal-oxydase. Wie durch die neueren Erkenntnisse der Warburg-Schule, daß sowohl Schardinger-Enzym als auch Aminosäure-oxydase *Flavinfermente* sind, *konstitutionschemisch* die Schranke zwischen den beiden Grenztypen gefallen ist, so erfolgt nunmehr auch durch die Ergebnisse an der Glucose-oxydase eine Überbrückung der Gegensätze.

Vielleicht ist es zweckmäßig, die Bezeichnung *Aero-dehydrasen* für die Gesamtgruppe zu wählen und die Benennung *Oxhydrasen* den betont acceptor-spezifischen Gliedern vorzubehalten.

C. Donator-spezifität.

Über das Verhalten der Glucose-oxydase gegenüber verschiedenen *Zuckern* lagen bisher nur einige ältere Angaben D. Müllers (S. 117 u. 122 a. a. O.) vor, der die O_2-Aufnahme von ungepufferten 0,45—0,5 m-Zuckerlösungen, die sich — auf Filtrierpapier aufgesaugt — in einem Respirometer befanden, nach 24 Stunden bestimmte. Eindeutig *nicht* oxydiert wurden Dioxyaceton, l-Arabinose und d-Xylose sowie d-Fructose; angegriffen wurden die *d-Formen* von *Glucose*, *Mannose* und *Galactose*, die unter den genannten Bedingungen bei 25° 12,4, 4,5 und 4,7 ccm O_2 verbrauchten; zieht man die erhebliche — nahezu das Äquivalent CO_2 liefernde — Eigenatmung der Präparate (1,9 ccm) ab, so resultiert — allerdings mit geringer Genauigkeit — für die Oxydation der 3 Hexosen das Geschwindigkeitsverhältnis *1:0,25:0,27.*

Wir haben mit einem weitgehend gereinigten, nahezu leeratmungsfreien Enzympräparat ($Q_{O_2} = 2000$) das Verhalten verschiedener Hexosen in „Normalansätzen“ (S. 125) unter einwandfreien Bedingungen geprüft. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Fig. 1 zur Anschauung gebracht.

Wie man sieht, tritt in unseren kurzdauernden Schüttelversuchen, wo der Substratverbrauch die Reaktionsgeschwindigkeit praktisch noch nicht beeinflußt, die Überlegenheit der *Glucose* noch stärker hervor als in den Versuchen

Müllers. Die 2 Stundenwerte der O_2-Aufnahmen von Glucose, Mannose und Galactose stehen im Verhältnis *1:0,07:0,14*. Von Interesse ist der raschere Umsatz der *Galactose*, verglichen mit Mannose, der im Gegensatz zu anderen biochemischen Erfahrungen, z. B. bei der alkoholischen Gärung, steht. Das bekannte, über die gemeinsame Enolform erreichte

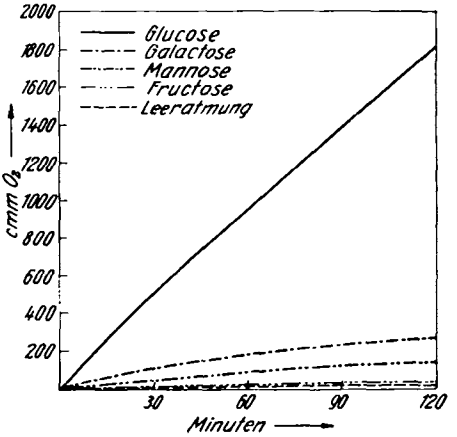


Fig. 1.

O_2-Aufnahme verschiedener Hexosen in Gegenwart gereinigter Glucose-oxydase (0,5 mg, $Q_{O_2} = 2000$).

Zymohexosen-gleichgewicht spielt aber in unseren Versuchen sicherlich keine Rolle, wie man schon an der Unangreifbarkeit der Fructose erkennt.

Mit einer innerhalb der Fehlergrenzen mit Galactose übereinstimmenden Geschwindigkeit wird auch *Maltose* von unserem gereinigten Ferment angegriffen. Das Umsatzverhältnis Maltose:Glucose ist also für unser Präparat mit $Q_{O_2} = 2000$ ebenfalls *0,14*, während sich in einem anderen Versuch mit einem Enzym von $Q_{O_2} = 960$ ein Geschwindigkeitsquotient von *0,20* und in einem dritten Ansatz mit einem Rohpräparat ($Q_{O_2} = 83$) ein Verhältnis von *0,41* ergeben hatte. Am einfachsten erklärt sich die mit der Enzymreinigung einhergehende Geschwindigkeitsabnahme der Maltoseoxydation durch die allmähliche Entfernung der *Maltase* (α-Glucosidase), deren Vorkommen in Rohpräparaten schon D. Müller nachgewiesen hatte. Die Existenz einer von der Glucose-oxydase verschiedenen Maltose *direkt* angreifenden „Maltose-oxydase", wie sie von Müller im wesentlichen auf Grund eines

kinetischen Vergleichs von Maltose-*spaltung* und *-oxydation* postuliert wird, halten wir für unwahrscheinlich, vor allem schon deswegen, weil Müller für ihre Wirkung doch wieder den Verbrauch von *zwei* Atomen Sauerstoff — also den gleichen wie im Fall der *primären Hydrolyse* — annehmen muß. Doch wird erst die geplante kinetische *und* präparative Untersuchung der Verhältnisse eine endgültige Entscheidung treffen lassen.

IV. Zur Frage nach der aktiven Gruppe der Glucose-oxydase.

Schon einleitungsweise (S. 120) waren drei verschiedene Möglichkeiten in bezug auf die chemische Natur der in der Glucose-oxydase enthaltenen Wirkgruppe angeführt worden. Für die Möglichkeit 3 — festgebundenes Pyridin-nucleotid (Codehydrase) — hat sich, außer dem dort bereits erwähnten Analogieargument, kein weiterer Anhaltspunkt im Verlaufe dieser Untersuchung ergeben. Auch für die Möglichkeit 1 — aktives Schwermetall-atom wie Cu oder Mn — haben sich keine Hinweise von größerem Gewicht auffinden lassen.

In Modellansätzen [$^{m}/_{5}$-Glucose gelöst in 2 m-$(NH_4)_2HPO_4$ vom p_H 8,2] ließen sich zwar durch Cu- und Mn-Zusätze von der Größenordnung eines Milligramms einwandfreie katalytische Effekte erzielen (Q_{O_2} für Cu ~ 100, für Mn ~ 10), doch hatten andererseits Metallzusätze zu einem Glucose-oxydasepräparat von $Q_{O_2} = 160$ keinen aktivierenden Effekt; nur bei einem reineren Präparat ($Q_{O_2} = 2200$) haben wir einmal bei Mn-Zugabe eine Aktivitätserhöhung um 20 Proc. beobachtet.

Gesteigertes Augenmerk haben wir der am leichtesten kontrollierbaren Möglichkeit 2 — Wirkgruppe von Farbstoffcharakter — geschenkt, im besonderen Maße natürlich, nachdem Warburg und Christian[1,2]) im Jahre 1938 für die unserem Ferment in ihren Eigenschaften nahestehende Aminosäure-oxydase eine *flavin*haltige prosthetische Gruppe nachgewiesen hatten.

Die Rohextrakte aus *Asp. niger* zeigen im allgemeinen eine schmutzigbraune Farbe, besonders wenn von conidienhaltigem Mycel ausgegangen und mit schwach alkalischer Phosphatlösung extrahiert

[1]) Naturwiss. **26**, 201, 235 (1938); Bio. Z. **295**, 261; **296**, 294; **297**, 417 (1938).

[2]) O. Warburg u. Christian, Bio. Z. **298**, 150 (1938); E. Haas, Bio. Z. **298**, 378 (1938).

worden war (S. 130 u. 133). Bei der Dialyse und beim Eindampfen fällt ein Großteil der färbenden Verunreinigungen aus, und bei der Alkohol-Ätherfällung werden im allgemeinen grauweiße Produkte erhalten. Bei weiterer Reinigung durch fraktionierte Aceton- und Ammonsulfatlösung tritt in zunehmendem Maße eine warm gelbbraune Färbung der Trockenpräparate auf, die auch in konzentrierteren Enzymlösungen deutlich erkennbar ist.

Wir haben, unserer Vermutung folgend, daß auch die Glucose-oxydase ein *Flavinferment* sei, eine Reihe unserer gereinigten Präparate der *Luminoflavin-reaktion* unterworfen.

Hierzu wurden — in Anlehnung an die neuesten Vorschriften der Warburg-Schule [1]) — je 50 mg Enzym in 5 ccm n-NaOH gelöst und 1 Stunde lang in einem wassergekühlten Reagenzglas mit einer Osram-Nitralampe bestrahlt. Dann wurde mit 2 n-HCl angesäuert und 2 mal mit je 10 ccm Chloroform extrahiert. Die Extrakte wurden auf 10 ccm eingeengt und unter der Quecksilberlampe auf Vorhandensein und gegebenenfalls Intensität einer gelbgrünen Fluorescenz geprüft. Zum Vergleich dienten Testlösungen bestimmten Luminoflavin-gehalts, die aus einer bestrahlten 5 mg-proc. Lactoflavinlösung [2]) durch Extraktion und entsprechendes Verdünnen mit Chloroform hergestellt waren.

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe, das wir für das wichtigste der Untersuchung halten, ist in Fig. 2 zur Anschauung gebracht. Wie man sieht, besteht eine — in Anbetracht der ziemlich rohen Flavinbestimmungsmethode — ausgezeichnete *Proportionalität zwischen Flavin-gehalt und Atmungsgröße* Q_{O_2} der verwendeten Fermentpräparate. Wir halten es dadurch für äußerst wahrscheinlich gemacht, daß dieser Flavin-gehalt der Präparate kein zufälliger ist, sondern der prosthetischen Gruppe der Glucose-oxydase angehört, diese also gleichfalls ein „gelbes Ferment" im Sinne Warburgs ist.

Nachdem in sämtliche heute bekannten „gelben Fermente" (vgl. Tab. 18, der noch die *Fumarat-hydrase* F. G. Fischers [3]) anzufügen wäre) — ausgenommen das „alte" Flavinferment — ein *Alloxazin-adenin-dinucleotid* eingeht, ist die Annahme sehr naheliegend, daß dies auch bei der Glucose-oxydase der Fall ist. Es mag immerhin — im

[1]) Vgl. Anmerkung 2, S. 146.

[2]) Herrn Prof. H. v. Euler, Stockholm, sind wir für die liebenswürdige Überlassung einer Probe reinen Lactoflavins zu Dank verpflichtet.

[3]) Naturwiss. **27**, 197 (1939).

Hinblick auf die nahe Verwandtschaft von Glucose-*dehydrase* und -*oxydase* (S. 121) — darauf hingewiesen werden, daß man sich dieses Dinucleotid aus der Cozymase durch das Eintreten des Alloxazinrestes an Stelle des Nicotinsäureamids entstanden denken kann.

Über den heute erreichten *Reinheitsgrad* der Glucoseoxydase lassen sich einstweilen auf Grund von Analogieschlüssen nur Vermutungen äußern. Sicher ist, daß auch unsere aktivsten Präparate noch nicht annähernd rein sind.

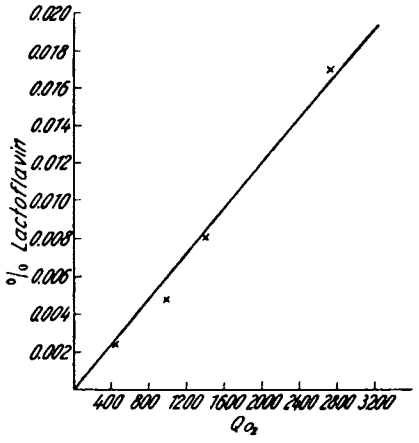


Fig. 2.
Flavin-gehalt von Enzympräparaten verschiedenen Q_{O_2}-Werts.

Um einen Überblick über die quantitativen Verhältnisse zu vermitteln, geben wir nachstehend für verschiedene im reinen oder annähernd reinen Zustand erhaltene „gelbe Fermente" eine Zusammenstellung der prozentischen *Flavingehalte*, der hieraus unter der Annahme, daß im Fermentmolekül *ein* Molekül Flavin enthalten ist, berechneten *Molekulargewichte* sowie der — im allgemeinen unter optimalen oder diesen nahekommenden Bedingungen bestimmten — „*spezifischen Aktivitäten*" Q_{O_2}.

Man erkennt, daß der Flavingehalt der Reinstpräparate durchweg in der Nähe von 0,5 Proc., entsprechend einem Molekulargewicht von rund 70000, liegt — mit alleiniger Ausnahme der Aminosäure-oxydase, von deren Trägerprotein Negelein und Brömel (a. a. O.) daher annehmen, daß der

Tabelle 18.

Ferment	Flavin in %	Mol.-Gew.	Untersuchtes Substrat bzw. System	Q_{O_2}
1. Schardinger-Enzym [1]) (Xanthin-dehydrase)	0,5	74000	Hypoxanthin	270 (38°)
2. Flavinferment [2]) [Warburg u. Christian 1932 [3])]	0,50—0,53	70—75000	Hexose-monophosphat + Dehydrase + Co-dehydrase II	1060 (38°)
3. Aminosäure-oxydase [4])	0,37 (0,53) [5])	100000 (70000) [5])	Alanin	26300 (38°) (37500) [5])
4. (Muskel-)Diaphorase [6])	0,54	70000	Lactat + Dehydrase + Codehydrase I + HCN + Methylenblau	160000 (38°)
5. (Hefe-)Diaphorase [7])	0,57	65000	Hexose-monophosphat + Dehydrase + Co-dehydrase II + Methylenblau	> 2600 (25°)

heute erreichte Reinheitsgrad erst 0,7 sei. Der — auch sonst in der Eiweißchemie [Serumalbumin, Hämoglobin [8])] wiederkehrende Wert von 70000 tritt in der Gruppe der Flavinfermente mit solcher Konstanz auf, daß auch die Glucose-oxydase — falls unsere Auffassung von ihrer Konstitution richtig ist — keine Ausnahme machen dürfte. Das würde aber bedeuten, daß unsere bisher besten Präparate mit einem Flavingehalt von 0,017 Proc. nur zu rund $^1/_{30}$ aus Glucose-oxydase beständen. Andrerseits würde sich aus der optimalen Aktivität dieser Präparate ($Q_{O_2} = 8000$) eine „spezifische Aktivität" des reinen Ferments von 240000 errechnen, ein unwahrscheinlich hoher Wert, wenn man bedenkt, daß die „Atmungsgrößen" der anderen *direkt* mit O_2

[1]) E. G. Ball, J. biol. Chem. **128**, 51 (1939).

[2]) H. Theorell, Bio. Z. **278**, 263 (1935).

[3]) Naturwiss. **20**, 980 (1932); Bio. Z. **254**, 438 (1932).

[4]) E. Negelein u. Brömel, Bio. Z. **300**, 225 (1939).

[5]) Eingeklammerte Werte beziehen sich auf das hypothetische Ferment vom Reinheitsgrad = 1.

[6]) F.B. Straub, Biochem. J. **33**, 787 (1939); H.S. Corran, Green u. Straub, Biochem. J. **33**, 793 (1939).

[7]) E. Haas, Bio. Z. **298**, 378 (1938).

[8]) Vgl. z. B. T. Svedberg, Koll. Z. **85**, 119 (1938); E. J. Cohn, Chem. Rev. **24**, 203 (1939).

reagierenden Fermente (1—3 der Tab. 18) um 1—2 Größenordnungen tiefer liegen. (Die Diaphorasen reagieren nicht oder äußerst langsam direkt mit O_2, weshalb in den Testversuchen Methylenblau als Überträger zugesetzt wurde.)

Wir halten es aus diesem und einem weiteren, gleich mitzuteilendem Grunde für sehr wohl möglich, daß unsere Präparate in Wirklichkeit schon erheblich reiner sind, als die Flavingehalte vermuten lassen. Warburg und Mitarbeiter haben nämlich für die gelöste Aminosäure-oxydase festgestellt, daß diese in sehr merklichem Umfang in aktive Gruppe und Trägerprotein dissoziiert, während allerdings das „alte" Flavinferment und die Haassche Hefe-Diaphorase keine derartige Dissoziation erkennen lassen. Hätte nun die Glucose-oxydase die gleiche Dissoziationskonstante wie die Aminosäure-oxydase, nämlich $2{,}5 \cdot 10^{-7}$ Mol/l, und wäre unser reinstes Präparat nicht 3,3-proc., sondern 10-proc., so würde unter den Bedingungen unseres üblichen Testversuchs — 0,5 mg Enzym/5 ccm — eine rund 70-proc. Dissoziation auftreten, d. h. wir würden in diesem Falle, da ja die Reaktionsgeschwindigkeit proportional der Konzentration des *undissoziierten* Symplexes ist, nur etwa $^1/_3$ der total vorhandenen enzymatischen Aktivität erfassen. Ob die Verhältnisse tatsächlich so liegen, wird die Fortsetzung der Untersuchung, bei der vor allem auch die Aufspaltung des Ferments in seine beiden Komponenten versucht werden soll, lehren.

Es mag zuletzt noch die auffallende, doch schon jetzt durch das Material der Tab. 18 erwiesene Tatsache hervorgehoben werden, daß die „spezifischen Aktivitäten" in der Gruppe der *Flavinfermente* um 2—3 Größenordnungen variieren, während in den *Häminfermenten* (Katalase, Peroxydase, Cytochrom-oxydase) nach R. Kuhn[1]) und J. B. S. Haldane[2]) die Reaktionsgeschwindigkeiten des *Eisens* gegenüber O_2 bzw. H_2O_2 in guter größenordnungsmäßiger Übereinstimmung stehen.

Wir danken der *Bayrischen Akademie der Wissenschaften* für den aus Mitteln der Brunck-Stiftung gewährten Forschungszuschuß. M. Deffner spricht außerdem der *Universität Athen* für das ihm verliehene Stipendium aus der Voltos-Stiftung seinen ergebenen Dank aus.

[1]) Naturwiss. **19**, 771 (1931); H. **201**, 255 (1931).
[2]) Proc. Roz. Soc. [B] **108**, 559 (1931).

Über makromolekulare Verbindungen.

231. Mitteilung[1]).

Über die Polyvinylchloride;

von *H. Staudinger* und *J. Schneiders*[2]).

Mit 6 Figuren im Text.

[Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.]

(Eingelaufen am 7. August 1939.)

1. Über das osmotische und viscosimetrische Molekulargewicht von Polyvinylchloriden.

Die physikalischen Eigenschaften der makromolekularen Stoffe, der Faserstoffe, Kunststoffe usw. hängen von der Bauart, der Größe und vor allem der Gestalt ihrer Makromoleküle ab[3]). Darum ist es wichtig, auch die Polyvinylchloride in bezug auf diese Faktoren hin zu untersuchen[4]); denn diese spielen als Kunststoffe[5]) zur Herstellung von Schläuchen, Leder, Lacken, Faserstoffen, Preßkörpern, Röhren usw. bei ihrer leichten Zugänglichkeit eine immer größere Rolle[6]).

In früheren Arbeiten wurde von den Polyvinylhaloiden das Polyvinylbromid und Polymerisationsprodukte des asym-

[1]) 230. Mitteilung: H. Staudinger u. J. Jurisch, Melliands Textilber., Oktoberheft.

[2]) Dissertation, Freiburg 1938 (D 25).

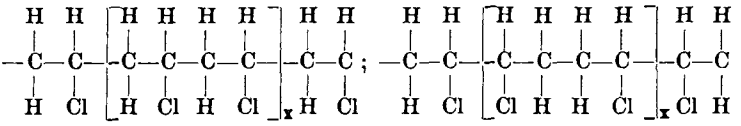
[3]) H. Staudinger, „Die hochmolekularen organischen Verbindungen, Kautschuk und Cellulose", Verlag Springer, Berlin 1932; B. 68, 1682 (1935).

[4]) Für die vorliegenden Untersuchungen erhielten wir in entgegenkommender Weise die verschiedenartigsten Präparate von den Direktionen der *I. G. Farbenindustrie*, *Bitterfeld* und *Rheinfelden* zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen.

[5]) Z. B. die Igelite der *I. G. Farbenindustrie.*

[6]) Vgl. Kunststoffwegweiser von Gg. Kränzlein u. R. Lepsius, Verlag Chemie 1937.

metrischen Dichloräthylens untersucht[1]). Durch Reduktion dieser Polymeren mit rotem Phosphor und Jodwasserstoff wurden höhermolekulare Paraffinkohlenwasserstoffe erhalten, die nach ihrem physikalischen Verhalten normale Paraffine sind. Da diese Paraffine 100—150 Kettenatome enthalten, so war damit der Beweis erbracht, daß sich bei der Polymerisation mindestens 50—75 Grundmoleküle durch Hauptvalenzen zu langen unverzweigten Fadenmolekülen zusammenlagern. Bei der Polymerisation dieser Vinylhaloide entstehen wie in anderen Fällen Gemische von Polymerhomologen[2]), deren Durchschnittspolymerisationsgrad von den Polymerisationsbedingungen abhängt. Die genaue Bindungsart der Grundmoleküle in den polymeren Produkten konnte noch nicht bewiesen werden; es ließ sich zwischen den beiden folgenden Formeln für die Polyvinylchloride kein Entscheid treffen.



1 2

x = 100—2500

Da die Polyvinylacetate entsprechend Formel 1 gebaut sind, da sich also das monomere Vinylacetat bei der Polymerisation zu Derivaten des 1,3- und nicht des 1,2-Glycols zusammenlagert[3]), so ist auch bei den Vinylhaloiden ein gleicher Polymerisationsverlauf wahrscheinlich, und es kommt für das Polyvinylchlorid voraussichtlich Formel 1 in Betracht.

Eine Untersuchung der Polyvinylchloride schien deshalb geboten, weil nach Viscositätsmessungen die technischen Produkte verhältnismäßig niedermolekular zu sein schienen,

---

[1]) H. Staudinger, M. Brunner u. W. Feisst, Helv. **13**, 805, 832 (1930).

[2]) H. Staudinger, B. **59**, 3019 (1926); Z. Ang. **42**, 67 (1929).

[3]) H. Staudinger, K. Frey u. W. Stark, B. **60**, 1782 (1927); H. Staudinger u. A. Schwalbach, A. **488**, 8 (1931); vgl. auch C. S. Marvel u. C. L. Levesque, Am. Soc. **60**, 280 (1938); C. S. Marvel u. C. E. Denoon jr., Am. Soc. **60**, 1045 (1938).

falls man aus ihnen mittels der bei niedermolekularen Paraffinen und Paraffinderivaten bestimmten K_m-Konstante das Molekulargewicht bzw. den Polymerisationsgrad berechnet[1]).

(1a) $$\frac{\eta_{sp}}{c_{gm}} = K_m \cdot M$$

(1b) $$\frac{\eta_{sp}}{c} = K_m \cdot P$$

Dabei ist M der Gleichung (1a) das Molekulargewicht und P der Gleichung (1b) der Polymerisationsgrad. η_{sp} ist die spezifische Viscosität, c_{gm} die Konzentration der Lösung in Grundmolen pro Liter, c die Konzentration in Gramm pro Liter. Die Konstante K_m beträgt für niedermolekulare Verbindungen mit Fadenmolekülen in Dioxan und Tetrahydrofuran, den besten Lösungsmitteln für die Polyvinylchloride, etwa $2 \cdot 10^{-4}$ [2]).

Unter Benutzung dieser Konstante besitzen die technischen Produkte einen Polymerisationsgrad von 100—300 bzw. ein Molekulargewicht von 6000—18000. Hiernach wären es also relativ niedermolekulare Produkte von fast noch hemikolloidem Charakter[3]). Die technischen Polyvinylchloride sind pulvrige Stoffe und haben das äußere Aussehen von hemikolloiden Polystyrolen[4]); andererseits lassen sie sich aber zu Kunststoffen hoher Festigkeit verarbeiten. Polystyrole, Cellulosen, Celluloseacetate[5]) mit Fadenmolekülen

---

[1]) H. Staudinger, Z. El. Ch. **40**, 434 (1934).

[2]) Die für Kohlenwasserstoffe ermittelte K_m-Konstante läßt sich für die Berechnung des Molekulargewichts von Polyvinylchloriden nicht ohne weiteres benutzen, da das spezifische Gewicht der letzteren erheblich größer ist als das der ersteren. Obige Beziehung 1a und 1b gilt nur für Lösungen, bei denen Lösungsmittel und gelöster Stoff annähernd gleiches spezifisches Gewicht haben [vgl. H. Staudinger u. F. Reinecke, B. **71**, 2521 (1938)]. Da die spezifische Viscosität von Squalenhydrochlorid und Squalenhydrobromid gleich ist der von gleichkonz. Lösungen von Squalen und Hydrosqualen, wurde zur vorläufigen Berechnung des Molekulargewichtes bzw. des Polymerisationsgrades die für Kohlenwasserstoffe ermittelte K_m-Konstante benutzt und abgerundet ein Wert von 2.10^{-4} in die Gleichung 1a bzw. 1b eingesetzt.

[3]) Über die Einteilung der Kolloide, H. Staudinger, B. **62**, 2893 (1929); **68**, 1682 (1935).

[4]) H. Staudinger u. Mitarbeiter, B. **62**, 241 (1929).

[5]) H. Staudinger u. K. Feuerstein, A. **526**, 72 (1936).

ungefähr der gleichen Kettenlänge, also Produkte hemikolloiden Charakters, besitzen noch keine besonders wertvollen technischen Eigenschaften.

Es wurde deshalb das Molekulargewicht von einer Reihe technischer Polyvinylchloride in Dioxan und Tetrahydrofuran nach der osmotischen Methode bestimmt und die so erhaltenen Werte mit den aus Viscositätsmessungen errechneten verglichen. Nach folgender Tab. 1 sind die in den technischen Produkten nach der osmotischen Methode ermittelten Durchschnittspolymerisationsgrade in Dioxan 5—8-mal, in Tetrahydrofuran 3—5-mal höher, als die aus Viscositätsmessungen errechneten Kettenlängen.

Die technischen Polyvinylchloride, die zu Kunststoffen verarbeitet werden, haben Durchschnittspolymerisationsgrade von 1000—2500, also Molekulargewichte von 60000—150000. Es sind also sehr hochpolymere Produkte. Deshalb ist es verständlich, daß sie wertvolle physikalische Eigenschaften besitzen.

Die Polyvinylchloride werden in der Technik aus dem monomeren Vinylchlorid durch Emulsionspolymerisation gewonnen[1]). Anfangs vermuteten wir, daß die gefundenen Abweichungen zwischen den osmotischen und viscosimetrischen Molekulargewichten darauf zurückzuführen seien, daß infolge von Verunreinigungen des technischen Vinylchlorids keine normalen Fadenmoleküle nach Formel 1 entstehen, sondern Produkte mit verzweigten Fadenmolekülen; für solche ist die Gleichung 1a bzw. 1b nicht gültig. Die Verunreinigung des Styrols durch Spuren von Divinylbenzol veranlaßt ja das Auftreten von stark verzweigten Makromolekülen[2]). Deshalb stellten wir Polyvinylchloride aus reinem Vinylchlorid her, das aus Äthylenchlorid in bekannter Weise gewonnen war; weiter reinigten wir das technische Produkt durch Destillation. Das reine Vinylchlorid wurde bei Gegenwart von Benzoylperoxyd, Bariumperoxyd oder Kalium-

[1]) C. Ellis, The Chemistry of synthetic Resins, The Reinhold Publishing Corporation, New-York 1935.

[2]) H. Staudinger u. W. Heuer, B. **67**, 1164 (1934); H. Staudinger u. E. Husemann, B. **68**, 1618 (1935).

Tabelle 1.

Vergleich der osmotisch und viscosimetrisch bestimmten Durchschnittspolymerisationsgrade und K_m-Werte von Polyvinylchloriden in Dioxan und Tetrahydrofuran.

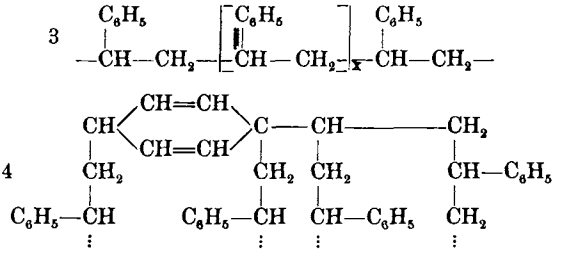
Nummer des Produkts	Art des Produkts	Durchschn. Polym.-Grad osm.	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ in		Kettenlänge visc. in		Polym.-Grad osm. / Kettenlänge viscos. in		$K_m \cdot 10^4$ in	
			Dioxan	Tetrahydrofuran	Dioxan	Tetrahydrofuran	Dioxan	Tetrahydrofuran	Dioxan	Tetrahydrofuran
V_2	T.[1]) gut verarbeitbar. .	2500	0,059	0,135	295	675	8,5	3,7	0,24	0,54
VI_2	T. schwer bzw. gar nicht verarbeitbar	2200	0,062	0,140	310	700	7,1	3,1	0,28	0,64
II_1	T. geeignet f. weiche u. harte Formlinge . .	1640	0,054	0,113	270	565	6,1	2,9	0,33	0,69
I_1	T.	1550	0,056	0,099	280	495	5,5	3,1	0,36	0,64
II_2	T. vgl. II_1	1400	0,053	0,103	265	515	5,3	2,7	0,38	0,74
III_1	T. eignet sich sehr schlecht f. Formlinge	1270	0,053	0,095	265	475	4,8	2,7	0,42	0,75
VII_1	L.[2]) 1,5 % BaO_2 . . .	1270	0,055		275		4,6		0,43	
VI_3	T. schwer bzw. gar nicht verarbeitbar	1000	0,055	0,105	275	525	3,6	1,9	0,55	1,05
III_2	T. vgl. III_1	980	0,056		280		3,5		0,57	
$VIII_2$	L. 1,5 % Benzoylperoxyd belichtet . . .	910	0,053		265		3,4		0,58	
IX_1	L. Monomeres aus Äthylenchlorid, 1,5% Benzoylperoxyd	880	0,051		255		3,4		0,58	
II_3	T. vgl. II_1	640	0,048	0,075	240	375	2,7	1,7	0,75	1,17
V_3	T. vgl. V_2	600	0,049	0,071	245	355	2,4	1,7	0,82	1,18
I_4	T.	560	0,048	0,069	240	345	2,3	1,62	0,86	1,23
II_4	T. vgl. II_1	450	0,045	0,054	225	270	2,0	1,66	1,00	1,20
III_3	T. vgl. III_1	365	0,044	0,048	220	240	1,66	1,52	1,20	1,31
X_1	L. 1,5 % Benzoylperoxyd, 200% Essigsäure-anhydrid belichtet	360	0,031	0,039	155	195	2,3	1,85	0,86	1,08
XI_2	L. 2 % $K_2S_2O_8 + H_2SO_4$ bei 85°	360	0,031	0,039	155	195	2,3	1,85	0,86	1,08
XII_1	L. 1,5% Benzoylperoxyd bei 55—65°	260	0,030	0,034	150	170	1,73	1,53	1,15	1,30
IV_2	T. für Lacke	260	0,033	0,037	165	185	1,57	1,40	1,27	1,42
X_2	L. vgl. X_1	245	0,029	0,033	145	165	1,7	1,48	1,18	1,35
IV_3	T. vgl. IV_2	220	0,029	0,032	145	160	1,5	1,38	1,32	1,45
XI_3	L. vgl. XI_2	185	0,023	0,026	115	130	1,6	1,42	1,25	1,40
$XIII_2$	L. 2 % Benzoylperoxyd 100—120°	165	0,019	0,022	95	110	1,74	1,50	1,18	1,33
X_3	L. vgl. X_1	160	0,019		95		1,68		1,18	
XIV	L. vgl. $XIII_2$	130	0,016	0,017	80	85	1,62	1,53	1,24	1,30
$XIII_3$	L. vgl. $XIII_2$	100	0,012	0,012	60	60	1,66	1,66	1,20	1,20

[1]) T. = Technisches Produkt. [2]) L. = Laboratoriumspräparat.

persulfat als Katalysator unter Belichten oder durch Erhitzen auf 60—120° polymerisiert. Das Molekulargewicht der so erhaltenen Polyvinylchloride wurde nach der osmotischen und weiter nach der viscosimetrischen Methode bestimmt, mit dem gleichen Ergebnis, daß die osmotischen Molekulargewichte weit höher als die aus Viscositätsmessungen errechneten sind. Danach bewirken nicht etwa Verunreinigungen des Vinylchlorids die gefundenen Abweichungen.

2. Über die K_m-Werte von fraktionierten Polyvinylchloriden.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß verzweigte Makromoleküle auch aus reinem Vinylchlorid entstehen; denn bei der Kettenreaktion können an den aktiven Enden der Kette, die gewissermaßen 3-wertige Kohlenstoffatome besitzen, unerwartete Umlagerungen eintreten[1]). So verläuft auch die Polymerisation des Styrols nicht zu Fadenmolekülen der Formel 3, sondern die Polystyrolmoleküle sind verzweigt, und zwar um so stärker, je höher die Temperatur bei der Polymerisation des Styrols gewählt wird[2]). Die Verzweigungen können durch Nebenreaktionen nach Formel 4 be-



dingt sein. Dabei entsteht bei ein und derselben Temperatur ein polymerhomologes Gemisch von Polystyrolen mit Fadenmolekülen ungefähr des gleichen Verzweigungsgrades; denn nach der Fraktionierung eines solchen Gemisches haben die einzelnen Fraktionen die gleiche K_m-Konstante. Für die verschiedenen Fraktionen eines bei gleicher Tempe-

[1]) H. Staudinger, B. **59**, 3035 (1926).
[2]) H. Staudinger u. G. V. Schulz, B. **68**, 2334 (1935).

ratur hergestellten Polystyrols gilt das Viscositätsgesetz, wie folgende Tabelle zeigt.

Tabelle 2.

K_m-Konstanten von fraktionierten Polystyrolen in Toluol[1]).

	Polymerisationstemperatur in °	Fraktion	M osmotisch	$\lim \frac{\eta_{sp}}{c_{gm}}$	$K_m \cdot 10^4$
1	20	I	638 000	79	1,25
		II	402 000	46	1,15
		III	193 000	24	1,25
2	60	I	600 000	50	0,83
		II	336 000	25	0,75
3	80	I	516 000	33,2	0,645
		II	420 000	27,2	0,65
		III	364 000	20,3	0,56
		IV	232 000	13,5	0,58
4	100,5	II	360 000	21,0	0,58
		III	275 000	16,2	0,59
		IV	170 000	9,2	0,54
5	132	II	335 000	17,0	0,51
		III	195 000	10,0	0,51
		IV	175 000	8,7	0,50
		V	110 000	5,6	0,51

Durch Fraktionieren von verschiedenen Präparaten kann man Polystyrole von gleichem Durchschnittspolymerisationsgrad erhalten, die bei verschiedenen Temperaturen gewonnen sind. Die $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werte solcher Produkte sind verschieden und ebenso besitzen sie verschiedene K_m-Konstanten, wie folgende Tabelle zeigt.

Nach diesen Erfahrungen nahmen wir an, daß auch bei den Polyvinylchloriden unbekannte Verzweigungen in den Makromolekülen, die bei der Kettenreaktion[2]) entstehen können, die Abweichungen vom Viscositätsgesetz verursachen.

[1]) Die Beispiele 1, 2, 3 sind der Arbeit von H. Staudinger u. G. V. Schulz, B. **68**, 2332 (1935), Tab. 9, entnommen, die Beispiele 4 und 5 der Arbeit von G. V. Schulz u. E. Husemann, Ph. Ch. (B) **36**, 184 (1937), Tab. 1 und 2.

[2]) Über die Kettenreaktionen vgl. H. Staudinger u. W. Frost, B. **68**, 2351 (1935); G. V. Schulz u. E. Husemann, Ph. Ch. (B) **34**, 187 (1936); Ergebn. d. ex. Naturw. **17**, 367 (1938).

Für das Auftreten solcher Nebenreaktionen kann die Tatsache sprechen, daß fast sämtliche technischen Polyvinylchloride 0,5—1 Proc. zu wenig Chlor besitzen. Sowohl bei der Emulsionspolymerisation[1]) wie auch bei der Polymerisation des Vinylchlorids im Laboratorium tritt eine geringe Abspaltung von Chlorwasserstoff ein.

Tabelle 3.

K_m-Konstanten von Polystyrolen gleichen Durchschnittsmolekulargewichtes, die bei verschiedener Temperatur gewonnen sind.

Polym.-Temp. in °	Fraktion	M osmotisch	$\frac{\eta_{sp}}{c_{gm}}$	$K_m \cdot 10^4$
20	III	193 000	24	1,25
132	III	195 000	10	0,51
20	I	638 000	79	1,25
60	I	600 000	50	0,83
60	II	336 000	25	0,75
80	III	364 000	20,3	0,56
100,5	II	360 000	21	0,58
132	II	335 000	17	0,51

Aus dem Mindergehalt an Chlor errechnet sich, daß auf etwa 50—100 Vinylchloridmoleküle 1 Molekül unter Chlorwasserstoffabspaltung in Reaktion getreten ist[2]).

Nach den bei der Polymerisation des Styrols gemachten Erfahrungen sollte man erwarten, daß unter gleichen Polymerisationsbedingungen die Nebenreaktionen gleichartig verlaufen; es sollte auch hier ein Gemisch von polymerhomologen Polyvinylchloriden entstehen, das durch Fraktionieren in Fraktionen von gleichem Bau zerlegt wird, für die das Viscositätsgesetz (1a) und (1b) für Fadenmoleküle gilt. Wir fraktionierten deshalb technische Polyvinylchloride und Laboratoriumspräparate mit dem Ergebnis, daß die Fraktionen eines Polyvinylchlorids nicht die gleichen K_m-Werte besitzen, sondern daß diese einen starken Gang aufweisen. (Vgl. Tab. 4, 5, 6 und 7.)

[1]) Nach einer freundlichen Mitteilung aus der Technik wird das p_H der Emulsion bei der Polymerisation kleiner.

[2]) Es ist nicht ausgeschlossen, daß bei der Polymerisation des Vinylchlorids mit Benzoylperoxyd Benzoylreste in das polymere Produkt eintreten, so daß dadurch der Mindergehalt an Chlor verursacht wird.

Die Polyvinylchloride verhalten sich also verschieden von den Polystyrolen, wie ein Vergleich der Tab. 4, 5, 6 und 7 mit der Tab. 2 zeigt.

Tabelle 4.

Bestimmung der K_m-Werte von Fraktionen eines technischen Polyvinylchlorides I in Dioxan und Tetrahydrofuran.

Fraktion	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ in Dioxan	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ in Tetrahydrofuran	Durchschn. Polymerisationsgrad osmotisch	$K_m \cdot 10^4$ in Dioxan	$K_m \cdot 10^4$ in Tetrahydrofuran
1	0,056	0,098	1550	0,36	0,64
2	0,053	0,097	1340	0,40	0,72
2	0,051	0,091	1040	0,49	0,87
4	0,048	0,069	560	0,86	1,23

Tabelle 5.

Bestimmung der K_m-Werte von Fraktionen eines technischen Polyvinylchlorides II in Dioxan und Tetrahydrofuran [1].

Fraktion	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ in Dioxan	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ in Tetrahydrofuran	Durchschn. Polymerisationsgrad osmotisch	$K_m \cdot 10^4$ in Dioxan	$K_m \cdot 10^4$ in Tetrahydrofuran
1	0,054	0,113	1640	0,33	0,69
2	0,053	0,103	1400	0,38	0,74
3	0,048	0,075	640	0,75	1,17
4	0,045	0,054	450	1,00	1,20
5	0,027	0,029	220	1,23	1,32

Tabelle 6.

Bestimmung der K_m-Werte von Fraktionen eines technischen Polyvinylchlorides III in Dioxan und Tetrahydrofuran [2].

Fraktion	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ in Dioxan	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ in Tetrahydrofuran	Durchschn. Polymerisationsgrad osmotisch	$K_m \cdot 10^4$ in Dioxan	$K_m \cdot 10^4$ in Tetrahydrofuran
1	0,053	0,095	1270	0,42	0,75
2	0,056	—	986	0,57	—
3	0,044	0,048	365	1,20	1,31

[1]) Von der Technik als für Preßkörper geeignet bezeichnet.

[2]) Von der Technik als für Lacke und Preßkörper ungeeignet bezeichnet.

Tabelle 7.

Bestimmung der K_m-Werte von Fraktionen eines selbst hergestellten Polyvinylchlorides[1]) X in Dioxan und Tetrahydrofuran.

Fraktion	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ in Dioxan	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ in Tetrahydrofuran	Durchschn. Polymerisationsgrad osmotisch	$K_m \cdot 10^4$ in Dioxan	$K_m \cdot 10^4$ in Tetrahydrofuran
1	0,031	0,039	360	0,86	1,08
2	0,029	0,033	246	1,18	1,34
3	0,019	—	160	1,18	—

Über den Gang der K_m-Werte[2]).

Ordnet man nun die verschiedenen Polyvinylchloride unabhängig von der Art ihrer Herstellung nach steigendem Polymerisationsgrad an, dann ergibt sich aus Tab. 1, daß, abgesehen von geringen Schwankungen, die K_m-Werte, nach Gleichung (1) berechnet, in regelmäßiger Weise abnehmen. Die Abnahme der K_m-Werte ist in Dioxan weit stärker als in Tetrahydrofuran. Dieser Unterschied zwischen den beiden Lösungsmitteln ist auf Grund früherer Beobachtungen verständlich; denn man macht z. B. auch bei Polystyrolen die Beobachtung, daß bei eukolloiden Produkten die Unterschiede zwischen den $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werten in guten und schlechten Lösungsmitteln weit beträchtlicher sind als bei mesokolloiden Produkten. Die $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werte von hemikolloiden Polystyrolen sind in guten und schlechten Lösungsmitteln ungefähr gleich, da beide Lösungsmittel diese kleinen Moleküle annähernd gleich solvatisieren[3]). Das Viscositätsgesetz (1) gilt also nur für Lösungen von polymerhomologen Polystyrolen in guten Lösungsmitteln.

---

[1]) Polymerisationsansatz: 10 ccm technisches Vinylchlorid, 20 ccm Essigsäureanhydrid, 0,15 g Benzoylperoxyd, belichtet mit 500 Watt-Lampe.

[2]) Über die Abnahme der K_m-Werte bei niederen Gliedern polymerhomologer Reihen, vgl. R. Fordyce u. H. Hibbert, Am. Soc. **61**, 1912 (1939).

[3]) H. Staudinger u. W. Heuer, Ph. Ch. (A) **171**, 129 (1934).

Die Beziehungen zwischen dem osmotisch ermittelten Polymerisationsgrad der Polyvinylchloride und den $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werten ihrer Sollösungen in Dioxan und Tetrahydrofuran lassen sich graphisch gemäß Fig. 1 wiedergeben.

Für die Technik ist es wichtig, den Durchschnittspolymerisationsgrad dieser Produkte nach einer einfachen Methode bestimmen zu können. Polyvinylchloride für Preß- und Kunststoffe müssen weit höher polymer sein als solche für Lackzwecke. Osmotische Molekulargewichtsbestimmungen eignen

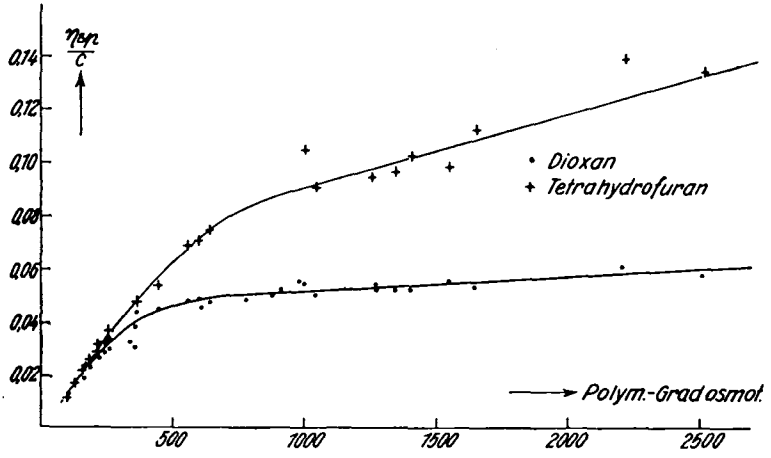


Fig. 1.

sich wegen ihrer langen Zeitdauer nicht für technische Untersuchungen. Dagegen kann man aus dem $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Wert eines Produktes mittels der obigen graphischen Darstellung seinen Durchschnittspolymerisationsgrad entnehmen; man hat dazu lediglich Viscositätsmessungen in einem Ostwald-Viscosimeter im Gebiet der Sollösungen durchzuführen; die Konzentration der zu messenden Lösung ist so zu wählen, daß ihre spezifische Viscosität etwa 0,1—0,15 beträgt.

4. K_m-Werte von chlorierten Polyvinylchloriden.

Nach der graphischen Darstellung 1 ist der Gang der K_m-Werte von Polyvinylchloriden in dem guten Lösungs-

mittel, dem Tetrahydrofuran[1]), nicht so erheblich wie in dem schlechten, dem Dioxan. Deshalb könnte man erwarten, daß in einem noch besseren Lösungsmittel als dem Tetrahydrofuran der Gang der K_m-Werte noch geringer würde; er könnte in einem solchen Lösungsmittel event. verschwinden, so daß für ein Lösungsmittel, mit dem die Polyvinylchloride praktisch in jedem Verhältnis mischbar sind, das Viscositätsgesetz für Fadenmoleküle gilt. Ein solch gutes Lösungsmittel für Polyvinylchloride ist aber noch nicht bekannt.

Deshalb untersuchten wir die leichtlöslichen chlorierten Polyvinylchloride, wie sie zur Herstellung der PC-Faser verwandt werden. Diese Produkte, bei denen etwa auf je 3 Vinylchloridmoleküle ein weiteres Chloratom substituiert ist, lösen sich infolge des unregelmäßigen Baus ihrer Makromoleküle[2]) weit leichter in organischen Lösungsmitteln auf, als die Polyvinylchloride selbst.

Das Molekulargewicht dieser nachchlorierten Polyvinylchloride wurde nach der osmotischen wie auch nach der viscosimetrischen Methode bestimmt. Das Ergebnis ist ungefähr das gleiche wie bei den Vinylchloriden; auch hier sind die nach der osmotischen Methode ermittelten Polymerisationsgrade bei den höchstmolekularen Produkten 3—5 mal höher als die nach der viscosimetrischen Methode berechneten[3]) (vgl. Tab. 8). Allerdings ist der Unterschied nicht so groß wie bei den Polyvinylchloriden selbst. Die $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werte der höchstmolekularen Produkte sind in Tetrahydrofuran und Dioxan nur wenig verschieden, da sich in beiden Lösungsmitteln die nachchlorierten Polyvinylchloride leicht lösen. Daraus kann man auf eine gute Solvatation der gelösten Makromoleküle schließen. Diese läßt sich auch daran erkennen, daß die höchstmolekularen Produkte unter starker Quellung ähnlich wie die eukolloiden Polystyrole und Nitro-

[1]) Die höchstmolekularen Polyvinylchloride vom Polymerisationsgrad 3000 und mehr sind auch in Tetrahydrofuran schwer löslich.

[2]) Vgl. H. Staudinger, Buch S. 34.

[3]) Auch hier wurde als K_m-Konstante 2.10^{-4} benutzt.

Tabelle 8.

Vergleich der osmotisch und viscosimetrisch bestimmten Polymerisationsgrade und der K_m-Werte von chlorierten Polyvinylchloriden in Dioxan und Tetrahydrofuran.

Nr. des Produktes	Art des Produktes	Durchschnittl. Polym.-Grad osmot.	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ in Dioxan	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ in Tetrahydrofuran	Kettenlänge viscos. in Dioxan	Kettenlänge viscos. in Tetrahydrofuran	Polym.-Grad osmot. / Kettenlänge viscos. in Dioxan	Polym.-Grad osmot. / Kettenlänge viscos. in Tetrahydrofuran	$K_m \cdot 10^4$ in Dioxan	$K_m \cdot 10^4$ in Tetrahydrofuran
I_1	T.[1]	3100	0,119	0,128	595	640	5,2	4,8	0,38	0,41
II_1	L.[2] chloriert in Tetrachloräthan bei 60°	2800	0,110	0,137	550	685	5,1	4,1	0,39	0,49
III_1	L. chloriert in Tetrachloräthan bei 100°	1270	0,100	0,112	500	560	2,5	2,3	0,79	0,88
I_2	T.	1200	0,083		415		2,9		0,69	
III_2	L. vgl. III_1 . . .	970	0,086	0,101	430	505	2,3	1,9	0,89	1,04
VI	L. chloriert in Tetrachloräthan bei 60°	800	0,077	0,082	385	410	2,1	1,95	0,96	1,02
I_3	T.	800	0,062	0,069	310	345	2,6	2,3	0,78	0,86
II_2	L. vgl. II_1	760	0,084	0,097	420	485	1,8	1,57	1,10	1,27
III_5	L. vgl. III_1 . . .	255	0,032	0,037	160	185	1,6	1,38	1,25	1,45

[1]) T. = technisches Produkt.

[2]) L. = Laboratoriumspräparat.

cellulosen in Lösung gehen. Trotz der guten Solvatation dieser chlorierten Produkte sind die K_m-Werte der hochmolekularen Produkte niedriger als die der niedermolekularen. Sie zeigen also einen ähnlichen Gang wie die der einfachen Polyvinylchloride.

Nach der Fig. 2 ist die Streuung der K_m-Werte hier ziemlich erheblich. Dies liegt daran, daß der Chlorgehalt der verschiedenen Produkte nicht der gleiche ist. Die $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werte der Lösungen von einzelnen Vertretern ändern sich ebenso wie die Löslichkeit mit ihrem Chlorgehalt.

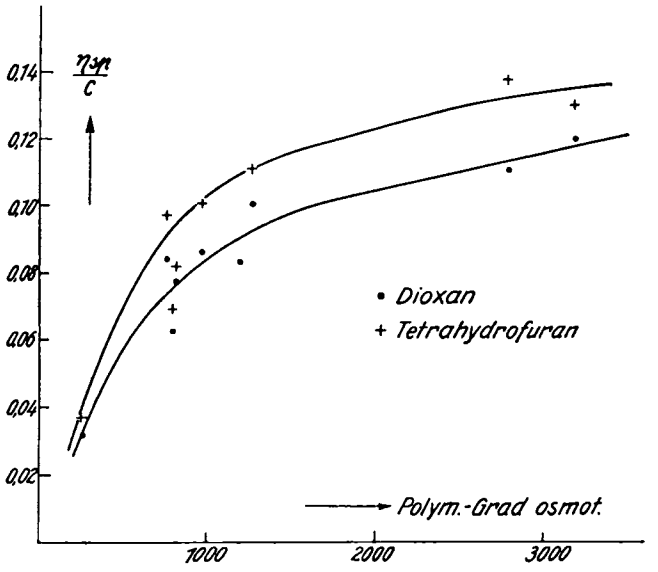


Fig. 2.

Beziehungen zwischen den Polymerisationsgraden und η_{sp}/c-Werten von chlorierten Polyvinylchloriden.

Trotz dieser Unstimmigkeit kann man unter Benutzung von Fig. 2 den Durchschnittspolymerisationsgrad von technischen nachchlorierten Polyvinylchloriden durch Viscositätsmessungen ungefähr ermitteln.

5. Die Mischpolymerisate aus Vinylchlorid und Vinylacetat.

Die Mischpolymerisate aus Vinylchlorid und Vinylacetat spielen in der Technik wegen ihrer leichten Löslichkeit zur Herstellung von Lacken eine Rolle. Da man bei diesen Produkten eine gute Solvatation annehmen konnte, wurden auch diese untersucht. Aber auch hier liegt der Durchschnittspolymerisationsgrad nach der osmotischen Methode weit höher als die viscosimetrisch ermittelte Kettenlänge.

Tabelle 9.

Vergleich der osmotisch und viscosimetrisch bestimmten Polymerisationsgrade und Bestimmung der K_m-Werte von Mischpolymerisaten aus Vinylchlorid und Vinylacetat in Dioxan.

Nr. des Produktes	Art des Produktes	Durchschnitts-Polym.Grad osmotisch	$\frac{\eta_{sp}}{c}$	Kettenlänge viscosimetrisch	Polym.Grad / Kettenlänge	$K_m \cdot 10^4$
I_1	L.*) 1 Vol. Vinylchlorid	1700	0,100	500	3,4	0,59
I_2	1 Vol. Vinylacetat	1100	0,078	390	2,8	0,71
I_3	1 % Benzoylperoxyd, belichtet	950	0,074	370	2,6	0,78
II_2	L. 1 Vol. Vinylchlorid 3 Vol. Vinylacetat, 1 % Benzoylperoxyd, belichtet	1150	0,069	345	3,3	0,60

*) L. = Laboratoriumspräparat.

Die K_m-Werte haben nach den vorliegenden Versuchen einen Gang. Die Zahl der Messungen ist noch nicht ausreichend genug, um die Beziehungen zwischen den $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werten und dem Polymerisationsgrad graphisch wiederzugeben.

6. Diskussion der Ergebnisse.

Sowohl bei den Polyvinylchloriden, den gechlorten Polyvinylchloriden als auch den Mischpolymerisaten findet man das gleiche Ergebnis, daß die nach der osmotischen Methode ermittelten Molekulargewichte weit höher sind als die aus Viscositätsmessungen errechneten Kettenlängen. Gleiche

Erfahrungen wurden auch bei Polyvinylacetaten, Polyvinylalkoholen und Polyacrylestern gemacht[1]). Es ist wichtig, die Ursache dieses Verhaltens kennenzulernen.

Durch geeignete Verbindung von Molekulargewichtsbestimmungen nach der osmotischen Methode mit Viscositätsmessungen läßt sich die Form der Makromoleküle in Lösung bestimmen; dabei kann man nach den bisherigen Untersuchungen folgende Gruppen von Molekülkolloiden unterscheiden[2]):

1. Molekülkolloide mit kugelförmigen Makromolekülen: Sphärokolloide. Beispiel: Glycogen[3]) und eine Reihe Proteine[4]). Die Viscosität ihrer Lösungen gehorcht dem Einsteinschen Gesetz. Die spezifische Viscosität gleichkonzentrierter Lösungen von Produkten verschiedenen Polymerisationsgrades ist die gleiche.

2. Produkte mit langgestrekten Fadenmolekülen. Beispiel: Cellulose und Derivate[5]), Mannane[6]) und Derivate, weiter die Polyester. Für Lösungen dieser Produkte gilt das Viscositätsgesetz für Fadenmoleküle [Gleichung (1a) bzw. (1b)]. Die $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werte von Lösungen polymerhomologer Produkte nehmen also proportional mit dem Polymerisationsgrad zu. Die K_m-Konstante für Lösungen von Cellulosederivaten ist ungefähr die gleiche, wie sie aus Viscositätsmessungen niedermolekularer Glucosederivate berechnet wird[7]). Ebenso gilt für die Polyester die gleiche K_{aeq}-Konstante[8]) wie für Paraffine und Paraffinderivate. Aus der

[1]) Dissert. H. Warth, Freiburg 1938.

[2]) H. Staudinger, B. **68**, 1682 (1935).

[3]) H. Staudinger u. E. Husemann, A. **530**, 1 (1937).

[4]) Vgl. H. Staudinger u. G. V. Schulz, B. **68**, 2336 (1935); R. Signer u. G. Boehm, Helv. Chim. Acta **14**, 1370 (1931).

[5]) H. Staudinger u. G. V. Schulz, B. **68**, 2320 (1935); H. Staudinger u. G. Daumiller, A. **529**, 219 (1937); H. Staudinger u. R. Mohr, B. **70**, 2296 (1937); H. Staudinger u. F. Reinecke, A. **535**, 47 (1938); B. **71**, 2521 (1938).

[6]) Versuche von E. Husemann.

[7]) H. Staudinger u. A. E. Werner, B. **70**, 2140 (1937).

[8]) Über die K_{aq}-Konstante vgl. H. Staudinger, Z. El. Ch. **40**, 434 (1934).

Allgemeingültigkeit dieser Konstanten ließ sich folgern, daß die Fadenmoleküle dieser Stoffe in Lösung langgestreckt sind, eine Annahme, die neuerdings auch durch ultrazentrifugale Untersuchungen von Signer und v. Tavel[1]) für Methylcellulosen bestätigt wurde.

3. Produkte mit verzweigten Fadenmolekülen. Beispiel: Stärke[2]) und Derivate, Polystyrole[3]). Die spezifische Viscosität polymerhomologer Produkte, also von Stoffen mit Makromolekülen gleichartiger Verzweigung, gehorcht dem Viscositätsgesetz für Fadenmoleküle[4]). Die K_m-Werte nach der Gleichung (1) sind kleiner als bei langgestreckten unverzweigten Fadenmolekülen. Aus der Abweichung der gefundenen von den für Fadenmoleküle ermittelten K_m-Werte kann man Rückschlüsse auf den Grad der Verzweigung der Makromoleküle ziehen.

4. Produkte mit Fadenmolekülen unbekannten Baus. Beispiele: Polyvinylchloride, Polyvinylacetate, Polyacrylsäureester.

Die einfachste Erklärung für den in den Fig. 1 und 2 wiedergegebenen Zusammenhang zwischen den $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werten und den osmotisch bestimmten Polymerisationsgraden der Polyvinylchloride und ihrer gechlorten Derivate besteht in der Annahme, daß für Lösungen dieser Produkte das Viscositätsgesetz nicht gültig ist, weil ihre Fadenmoleküle in Lösung nicht langgestreckt, sondern mehr oder weniger gekrümmt sind[5]). Eine derartige Krümmung könnte mit einer größeren Beweglichkeit dieser Gruppe von Fadenmolekülen zusammenhängen; diese Krümmung müßte um so stärker auftreten, je länger die Fadenmoleküle sind. Durch eine derartige Annahme fänden die Beziehungen, die zwischen den $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werten und den Polymerisationsgraden

[1]) H. Signer u. P. v. Tavel, Helv. Chim. Acta **21**, 535 (1938).

[2]) H. Staudinger u. E. Husemann, A. **527**, 195 (1937).

[3]) H. Staudinger u. G. V. Schulz, B. **68**, 2320 (1935).

[4]) Vgl. Tab. 2 dieser Arbeit.

[5]) Eine Reihe Autoren nehmen auf Grund von Berechnungen an, daß die viscosimetrischen Molekulargewichte zu hoch seien; tatsächlich ist gerade das Gegenteil der Fall.

bestehen, eine Erklärung (vgl. die graphischen Darstellungen 1 und 2). Während die osmotischen Bestimmungen den wirklichen Polymerisationsgrad ergeben, würde sich dann aus den Viscositätsmessungen eine Vorstellung über die Länge der Moleküle ableiten lassen; es müßten die Fadenmoleküle der höchstmolekularen Produkte in Lösung auf das 6 bis 8-fache zusammengekrümmt sein[1]).

Bei dieser Annahme sind 2 Arten von Fadenmolekülen zu unterscheiden:

a) gestreckte Fadenmoleküle[2]), wie z. B. die der Cellulose, Mannane und der Polyester; für diese gilt das Viscositätsgesetz.

b) gekrümmte Fadenmoleküle: hierher gehören vor allem Polyvinylchloride und Polyvinylacetate.

So gut sich scheinbar mit der Annahme von 2 Arten von Fadenmolekülen die experimentellen Befunde erklären lassen, so stehen ihr doch Bedenken entgegen, denn man sollte annehmen, daß sich die Lösungen der beiden Gruppen von Fadenmolekülen auch sonst in ihrem Viscositätsverhalten unterscheiden. Man sollte z. B. erwarten, daß Lösungen der hochmolekularen Polyvinylchloride andere Abweichungen vom Hagen-Poiseuilleschen Gesetz aufweisen als solche mit starren Fadenmolekülen gleichen Polymerisationsgrades, da sich die Form der beweglichen Fadenmoleküle mit zunehmender Strömung ändern müßte[3]). Dies ist aber nicht

---

[1]) Über die Krümmung von Fadenmolekülen vgl. W. Kuhn, Z. a. Ch. **51**, 640 (1935).

[2]) Die Fadenmoleküle sind in Lösung nicht starr, sondern führen elastische Schwingungen aus.

[3]) Die Abweichungen vom Hagen-Poiseuilleschen Gesetz, die Lösungen mit starren Fadenmolekülen zeigen, nehmen mit zunehmender Länge der Moleküle zu. Sie sind bei Lösungen von Eukolloiden sehr beträchtlich, während sie bei solchen von Hemikolloiden noch nicht auftreten. H. Staudinger u. M. Machemer, B. **62**, 2921 (1929); H. Staudinger, Die hochmolekularen organischen Verbindungen Kautschuk und Cellulose, Verlag Springer 1932, S. 188; H. Staudinger u. M. Sorkin, B. **70**, 1993 (1937); Diese Abweichungen vom Hagen-Poiseuilleschen Gesetz hängen mit einer Orientierung der starren Fadenmoleküle mit zunehmender Strömung zusammen. Vgl. R. Signer u. Mitarbeiter, Z. Ph. Ch. (A) **150**, 257 (1930); Helv. chim. Acta **14**, 1370 (1931); **16**, 418 (1933).

der Fall; die Lösungen der hochmolekularen Polyvinylchloride bzw. die Mischpolymerisate vom Polymerisationsgrad 2500 zeigen vielmehr keine Abweichungen vom Hagen-Poiseuilleschen Gesetz (vgl. Tab. 10). Sie verhalten sich wie Lösungen mit relativ kurzen, starren Fadenmolekülen, also wie hemikolloide und mesokolloide Celluloselösungen.

Tabelle 10.

Viscositätsmessungen an Mischpolymerisaten aus Vinylchlorid und Vinylacetat bei verschiedenen Geschwindigkeitsgefällen [1]).

Nr. des Produktes	Polym.-Grad	c g/Liter	Druck in mm Wasser (P)	Durchfluß-zeit in Sek. (t)	Pt	Gefälle
V_3 umgefällt	2500	0,547	84	746,1	6300	195
			181	336,2	6100	433
			371	162,7	6000	894
			530	112,4	6000	1290
			679	88,0	6000	1650
			910	66,8	6000	2180
			978	61,7	6000	2360
			1210	49,5	6000	2940
			1427	41,7	6000	3490
			2093	28,7	6000	5060
V_2	2500	1,38	205	323,0	6700	451
			394	167,2	6600	871
			574	114,2	6500	1275
			999	65,2	6500	2230
			1359	49,1	6700	2965
			1685	39,2	6600	3710
			2079	31,9	6600	4560

Es ist aber nicht verständlich, daß für eine Reihe von Polyvinylderivaten das Viscositätsgesetz nicht gilt, während es für Polystyrole Gültigkeit besitzt (vgl. Tab. 2).

Darum ist zur Erklärung der Unstimmigkeiten, die sich bei den Polyvinylchloriden vorfinden, auch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß die Makromoleküle derselben keine Fadenmoleküle sind, sondern daß sie wie die Polystyrolmoleküle Verzweigungen enthalten. Diese Verzweigungen müßten um so stärker auftreten, je höher polymer das betreffende Produkt ist. Für die Annahme, daß die Polyvinyl-

[1]) Die Messungen wurden von R. Mohr und G. Chamard-Bois ausgeführt.

chloride einen komplizierteren Bau haben, als durch Formel I wiedergegeben wird, spricht schon die Tatsache, daß dieselben einen zu geringen Chlorgehalt besitzen.

Eine Verzweigung könnte man sich dadurch entstanden denken, daß, während in der Regel die Vinylchloridmoleküle sich in 1,3 Glycolstellung zusammenlagern, ab und zu eine Zusammenlagerung in einer 1,2 Glycolstellung eintritt. Bei letzterem Fall ist die Chlorwasserstoffabspaltung bevorzugt, und dadurch können neue reaktionsfähige Reste entstehen, die die Verzweigung veranlassen.

Die Polymerisation des Vinylchlorids müßte sich dann von der des Styrols derart unterscheiden, daß die Nebenreaktion unabhängig von der Polymerisationstemperatur erfolgt, und zwar derart, daß auf je 50—100 normale Aneinanderkettungen *eine* anormale eintritt.

Unter diesen Voraussetzungen würde sich bei der Polymerisation des Vinylchlorids stets ein Gemisch von Polymerhomologen bilden, von dem die niedermolekularen Anteile weniger verzweigt sind als die hochmolekularen. Solche fehlerhafte Stellen in Makromolekülen, die durch Nebenreaktionen entstehen, lassen sich in der Regel kaum nachweisen, da sich die Zusammensetzung solcher fehlerhafter Makromoleküle kaum von der der normal gebauten unterscheidet. Nur in besonders günstigen Fällen läßt sich ein Einblick in ihrem Aufbau gewinnen, wie z. B. bei den verzweigten Makromolekülen aus Styrol und Divinylbenzol[1]). In diesem Punkt unterscheidet sich die makromolekulare Chemie wesentlich von der niedermolekularen. Wenn niedermolekulare Stoffe in einer Ausbeute von 99 Proc. unter Bildung eines niedermolekularen Produktes reagieren, so wird man in den seltensten Fällen dem Nebenprodukt eine Beachtung schenken. Das Hauptprodukt wird sich in den meisten Fällen durch Destillation und Krystallisation rein darstellen lassen. Wenn dagegen niedermolekulare Produkte durch Kettenreaktionen oder Polykondensationsprozesse unter Bildung von makromolekularen Produkten reagieren, so werden solche Neben-

[1]) H. Staudinger u. W. Heuer, B. **67**, 1164 (1934); H. Staudinger u. E. Husemann, B. **68**, 1618 (1935).

reaktionen eine Anderung im Bau der Makromoleküle hervorrufen; diese können das physikalische Verhalten des makromolekularen Produktes stark beeinflussen, sich aber dabei chemisch nur schwer nachweisen lassen. Eine Abtrennung des durch Nebenreaktionen entstandenen Produktes ist hier nicht möglich, weil ja die fremde Gruppe in die Makromoleküle eingebaut ist. Auf solchen fehlerhaften Stellen in den Makromolekülen können also die Unterschiede zwischen den osmotischen und viscosimetrischen Molekulargewichten bei den Polyvinylchloriden beruhen.

Bei dem heutigen Stand der Versuche können wir noch keinen definitiven Entscheid zwischen den beiden Möglichkeiten des Aufbaus der Polyvinylchloride treffen; wir hoffen aber, durch Untersuchung von anderen Polymerisaten schließlich zu einer Lösung dieser wichtigen Frage zu kommen. Eine endgültige Bestimmung der Form der Makromoleküle ist für das Verständnis aller dieser Kunststoffe von Bedeutung, da die physikalischen Eigenschaften der festen Stoffe von der Gestalt ihrer Makromoleküle auf das stärkste beeinflußt werden. Es ist zu erwarten, daß die Chemie und Physik der Kunststoffe sich erst dann auf wissenschaftlicher Grundlage weiter entwickeln können, wenn über die Konstitution der Makromoleküle genauere Kenntnisse vorhanden sind.

I. Polyvinylchloride.

1. Darstellung, Löslichkeit und Fraktionierung der Polyvinylchloride.

Es ist schon lange bekannt, daß das Vinylchlorid am Licht polymerisiert[1]). Weiter weiß man, daß durch Zusatz von Peroxyden die Polymerisation beschleunigt wird[2]). Wenn man in dieser Weise reines Vinylchlorid polymerisiert, erhält man harte, schwer zu verarbeitende Massen. In der Technik wird deshalb das Vinylchlorid in Emulsion poly-

[1]) E. Baumann, A. **163**, 317 (1872); I. Ostromysskensky, Zentr.-Bl. **1923**, IV, 606.

[2]) Amerik. Patent 1241738; D.R.P. 362666; Engl. Pat. 319591; Canad. Pat. 348471; ferner Ellis, a. a. O. II, S. 1037.

merisiert. Dabei werden die Polyvinylchloride als lockere Pulver erhalten. Je nach dem Polymerisationsverfahren und je nach den Polymerisationsbedingungen kann man Polymerisate von höherem oder geringerem Durchschnittspolymerisationsgrad erhalten. Die relativ niedermolekularen Produkte, die einen Durchschnittspolymerisationsgrad von etwa 300—500 haben, sind verhältnismäßig leicht löslich und dienen zur Herstellung von Lacken; die hochmolekularen Produkte vom Durchschnittspolymerisationsgrad 1000—2000 werden zu Kunststoffen nach dem Preßverfahren verarbeitet.

Die Polyvinylchloride sind in Wasser unlöslich, in vielen organischen Lösungsmitteln, wie z. B. Äther, Benzol, Methanol ebenfalls schwer- oder unlöslich; relativ leicht lösen sie sich in chlorhaltigen Lösungsmitteln wie Tetrachloräthan besonders in der Wärme auf, ebenso sind sie in Dioxan leicht löslich; das beste Lösungsmittel ist Tetrahydrofuran[1]), in dem sich auch von hochmolekularen Produkten 2—3-proc. Lösungen herstellen lassen.

Die Polyvinylchloride sind wie alle synthetischen hochpolymeren Gemische von Polymerhomologen[2]), die sich durch Fraktionieren in höher- und niedermolekulare Anteile zerlegen lassen[3]). Zu diesem Zweck wurden die Präparate aus ihren 2—3-proc. Dioxanlösungen durch allmählichen Zusatz von Methanol fraktioniert ausgefällt; die jeweils ausgeschiedenen Fraktionen wurden dann durch Zentrifugieren abgetrennt und i. Hochv. bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wozu je nach dem Präparat 3 Tage bis 1 Woche nötig waren.

2. Analysen der Polyvinylchloride.

Die Polyvinylchloride wurden von S. Kautz nach der Methode von Pregl analysiert. Dabei zeigte sich, daß die

---

[1]) Für die liebenswürdige Überlassung dieses Lösungsmittels danken wir der Direktion der I. G. Farbenindustrie Akt.-Ges., Ludwigshafen, bestens.

[2]) H. Staudinger, B. **59**, 3022 (1926); Z. Ang. **42**, 69 (1929).

[3]) Eine genaue Fraktionierung zur Ermittlung der Verteilungskurven nach G. V. Schulz, Ph. Ch. (B) **32**, 27—45 (1936) wurde bisher nicht vorgenommen.

Chlorgehalte bei Doppelmessungen häufig bis zu 0,5 Proc. schwanken, während bei Kontrollanalysen die Übereinstimmung sehr gut ist[1]). Die Abweichungen bei den Polyvinylchloriden beruhen möglicherweise auf der Inhomogenität des Materials. Es ergibt sich aus den Analysen, daß die

Tabelle 11a.

Nr. des Produktes	Herstellung	% C	% H	% Cl	% Asche
	Berechnete Werte	38,41	4,84	56,75	
V_2	Technisches Produkt, gut	38,63	5,04	55,98	0,26
		38,59	5,07	55,94	—
		38,90	5,09	55,98	—
II_1	Technisches Produkt, gut	39,20	5,15	55,95	—
		38,54	5,03	55,99	0,18
		38,55	4,92	—	0,17
II_4	Technisches Produkt, gut	38,55	5,02	56,22	0,65
		38,74	5,19	56,18	0,43
		38,67	5,18	56,34	0,67
III_3	Technisches Produkt, schlecht	38,60	5,08	55,83	—
		38,57	5,06	—	—

Tabelle 11b.

IX_2	Aus Äthylenchlorid gewonnen und mit Benzoylperoxyd polymerisiert	38,54	5,02	56,42	—
		38,48	5,02	56,29	—
				56,04	—
				56,10	—
				56,21	—

Tabelle 11c.

—	Ohne Katalysator in 3—4 Monaten polymerisiert	38,55	5,15	56,34	0,15
		38,45	5,07	56,21	0,07
		38,72	5,12	56,17	
VII_1	Aus Äthylenchlorid gewonnen und mit BaO_2 polymerisiert	38,49	4,95	56,46	0,30
		38,60	4,93	56,28	0,30
				56,37	—

Tabelle 11d.

—	Aus technischem Vinylchlorid; 48 Stunden bei 100—120° polymerisiert	39,56	5,08	55,18	—
		39,38	5,05	55,61	—
				55,13	—
				55,21	—

[1]) p-Dibrombenzol; ber. Br. 67,76, gef. Br. 67,75, 67,78. Trichlorphenol; ber. Cl. 53,89, gef. Cl. 53,89, 53,88.

technischen Produkte durch Salzsäureabspaltung $^1/_2$—1 Proc. Chlor weniger enthalten als sich aus der Formel berechnet (vgl. Tab. 11a).

Ein aus Äthylenchlorid durch Einwirkung von Benzoylperoxyd selbst hergestelltes Produkt enthält etwa $^1/_2$ Proc. Chlor zu wenig; möglicherweise beruht dies darauf, daß ein Teil des Katalysators im Molekül verbleibt (vgl. Tab. 11b). Die Chlorgehalte eines ohne Katalysator hergestellten Produktes und eines mit BaO_2 aus Äthylenchlorid gewonnenen Polymerisates nähern sich, wie Tab. 11c zeigt, den theoretischen Werten. Ein durch Erhitzen von Vinylchlorid auf 100—120° hergestelltes Polymerisat besitzt, wie die Tab. 11d zeigt, den besonders geringen Chlorgehalt von 55,2 Proc.

3. Chemisches Verhalten der Polyvinylchloride.

Auffallend ist die Beständigkeit der Polyvinylchloride gegen Säuren, Alkalien und Oxydationsmittel. Die Chloratome sind in diesem hochpolymeren Produkt viel schwerer gegen andere Gruppen austauschbar als die niedermolekularer Verbindungen. Diese Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit von Substituenten zwischen makromolekularen und niedermolekularen Produkten sind noch weiter zu bearbeiten[1]). Auf dieser Beständigkeit des Polyvinylchlorids beruht der Wert der aus ihm hergestellten Kunststoffe.

Unangenehm bemerkbar macht sich beim Verarbeiten des Polyvinylchlorids, daß in der Wärme eine geringe Chlorwasserstoffabspaltung eintritt. Oberhalb 150° erweichen die Polyvinylchloride und können dann zu Preßmassen verarbeitet werden. Dabei kann mehr oder weniger starke Chlorwasserstoffabspaltung eintreten, die beim Erhitzen über 200° erheblich wird; bei noch höherer Temperatur verkohlen die Produkte.

---

[1]) Zahlreiche makromolekulare Produkte zeigen ein anderes chemisches Verhalten als die entsprechend gebauten niedermolekularen; so ist z. B. Polyacrylsäureester und vor allem der Polymethacrylsäureester viel schwerer zu verseifen als entsprechende niedermolekulare Produkte.

Die höherpolymeren Polyvinylchloride spalten etwas weniger Chlorwasserstoff ab als die niederpolymeren. Um die Menge der Chlorwasserstoffabspaltung zu bestimmen, wurden abgewogene Proben von Polyvinylchlorid auf 156° bzw. auf 174° erhitzt mit folgendem Resultat.

Tabelle 12.

HCl-Abspaltung von technischen Polyvinylchloriden beim Erhitzen auf 156° bzw. 174°.

Produkt	Durchschnittspolymerisationsgrad	Dauer des Erhitzens in Stunden bei 156°	Abgespaltene Menge HCl in %	Dauer des Erhitzens in Stunden bei 174°	Abgespaltene Menge HCl in %
IV	300	1	1,048	1	2,14
V	2000	1	0,187	1	0,444
VI	1800	1	0,136	1	0,246
V	2000	10	1,30	10	5,00
VI	1800	14	1,30	14	5,00

Der Zusammenhang zwischen der Zersetzlichkeit der Polyvinylchloride und ihrem Bau muß noch näher untersucht werden[1]).

4. Molekulargewichtsbestimmungen.

Molekulargewichtsbestimmungen wurden in Dioxan- und Tetrahydrofuranlösung nach der osmotischen Methode vorgenommen[2]). In dem guten Lösungsmittel Tetrahydrofuran nehmen die p/c-Werte der Polyvinylchloride mit steigender Konzentration zu. In diesem Lösungsmittel verhalten sich die Polyvinylchloride wie alle Linearkolloide in guten Lösungsmitteln[3]). In Dioxan sind dagegen merkwürdigerweise die p/c-Werte annähernd konstant oder nehmen mit steigender Konzentration etwas ab. Die Polyvinylchloride verhalten sich also in diesem schlechten Lösungsmittel wie die

[1]) Möglicherweise beruht die größere Unbeständigkeit der niederpolymeren Polyvinylchloride beim Erhitzen darauf, daß die Chloratome am Ende der Ketten reaktionsfähiger sind als die mittelständigen.

[2]) Über die Apparatur vgl. G. V. Schulz, Ph. Ch. (A) **176**, 317 (1936).

[3]) H. Staudinger u. G. V. Schulz, B. **68**, 2336 (1935).

Sphärokolloide. Auch bei Nitrocellulosen steigen die p/c-Werte nur in guten Lösungsmitteln mit steigender Konzentration an, in Nitrobenzol sind sie dagegen annähernd konstant[1]) wie Fig. 3 zeigt[2]).

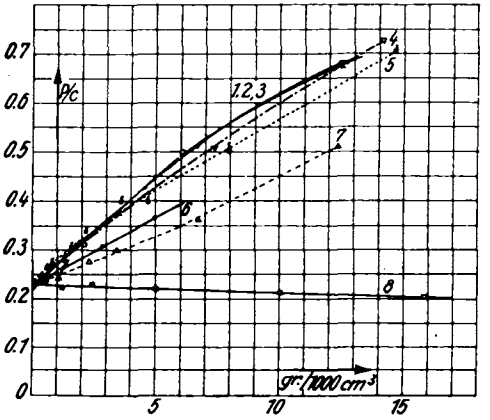


Fig. 3.

Änderung des Verhältnisses p/c der Lösungen von Nitrocellulose mit der Konzentration.

Lösungsmittel: 1. Benzoesäureäthylester + 11 Proc. abs. Alkohol. — 2. Salicylsäuremethylester + 20 Proc. CH_3OH. — 3. Acetophenon + 3 Proc. abs. Alkohol. — 4. Cyclohexanon + 5,8 Proc. abs. Alkohol. — 5. Aceton. — 6. Essigsäure. — 7. Methylalkohol. — 8. Nitrobenzol.

Wie bei Nitrocellulosen sind auch bei Polyvinylchloriden die Limeswerte in verschiedenen Lösungsmitteln annähernd gleich groß, wie folgende graphischen Darstellungen zeigen (vgl. Fig. 4 und 5).

Durch Bestimmung der p/c-Kurven in verschiedenen Lösungsmitteln hat man eine Kontrolle für die richtige Ermittlung der Limeswerte. In den folgenden Tab. 13, 14, 15 werden die Resultate von einigen Messungen an fraktionierten, technischen Präparaten angeführt.

---

[1]) A. Dobry, Bl. **1935**, 1882; A. Dobry u. A. Schwab, Bl. **1936**, 1790; A. Dobry, J. Chim. Phys. **32**, 50 (1935).

[2]) A. Dobry, Koll. Z. **81**, 190 (1937). Die graphische Darstellung ist dieser Arbeit entnommen.

Tabelle 13.

Osmotische Messungen an techn. Polyvinylchloriden I in Dioxan bei 27°.

Fraktion	c in g/Liter	$p \cdot 10^3$	$p/c \cdot 10^3$	Durchschnittsmolekulargewicht	Durchschnittspolymerisationsgrad
1	1,57	0,39	0,25	98000	1550
	1,97	0,49	0,25		
	3,99	1,00	0,25		
	4,08	1,06	0,26		
	4,00	1,00	0,25	aus lim	
	6,00	1,49	0,25	$p/c = 0{,}25 \cdot 10^{-3}$	
	7,96	1,96	0,25		
	10,10	2,38	0,24		
2	2,00	0,58	0,29	82000	1310
	2,05	0,61	0,30		
	2,08	0,60	0,29		
	3,05	0,92	0,30		
	4,13	1,21	0,29	aus lim	
	5,13	1,53	0,30	$p/c = 0{,}30 \cdot 10^{-3}$	
	6,00	1,78	0,30		
	8,14	2,53	0,31		
	10,00	3,12	0,31		
3	2,09	0,82	0,39	64000	1040
	4,00	1,59	0,40	aus lim	
	5,98	2,28	0,38	$p/c = 0{,}38 \cdot 10^{-3}$	
	8,00	3,01	0,38		
4	2,04	1,45	0,71	35000	560
	2,05	1,44	0,70	aus lim	
	6,14	4,31	0,70	$p/c = 0{,}70 \cdot 10^{-3}$	
	9,72	6,88	0,71		

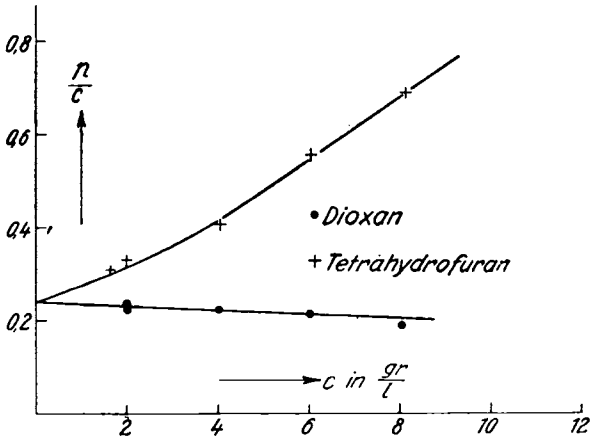


Fig. 4. Bestimmung des lim p/c-Wertes von Polyvinylchlorid II, Fraktion 1.

Tabelle 14.

Osmotische Messungen an technischen Polyvinylchloriden II in Tetrahydrofuran und Dioxan bei 27°.

Fraktion	c in g/Liter	$p \cdot 10^3$	$p/c \cdot 10^3$	Durchschnittsmolekulargewicht	Durchschnittspolymerisationsgrad
			In Tetrahydrofuran		
1	1,56	0,48	0,31	aus lim $p/c = 0{,}24 \cdot 10^{-3}$	
	2,00	0,69	0,34	102000	1640
	1,98	0,68	0,34		
	3,96	1,55	0,39		
		1,71	0,43		
	5,92	3,25	0,55		
	8,02	5,58	0,69		
		5,51	0,69		
			In Dioxan		
1	2,00	0,49	0,24		
	2,01	0,46	0,23	aus lim $p/c = 0{,}24 \cdot 10^{-3}$	1640
	2,00	0,47	0,24	102000	
	4,00	0,88	0,22		
		0,94	0,23		
	6,00	1,18	0,20		
		1,26	0,21		
	8,00	1,54	0,19		
		1,52	0,19		
2	2,00	0,56	0,28	aus lim	
		0,61	0,30	$p/c = 0{,}28 \cdot 10^{-3}$	1400
	4,08	1,06	0,26	87900	
		1,11	0,27		
3	2,01	1,24	0,62	aus lim	640
		1,25	0,62	$p/c = 0{,}62 \cdot 10^{-3}$	
	2,03	1,28	0,63	39700	
		1,32	0,65		
4	2,00	1,72	0,86	aus lim	
		1,76	0,88	$p/c = 0{,}87 \cdot 10^{-3}$	450
	4,02	3,47	0,86	28300	
		3,51	0,87		
5	2,01	3,75	1,86	aus lim	
		3,80	1,89	$p/c = 1{,}80 \cdot 10^{-3}$	220
	2,01	3,52	1,75	13700	
	4,05	7,44	1,84		

Tabelle 15.

Osmotische Messungen an technischem Polyvinylchlorid V in Tetrahydrofuran und Dioxan bei 27°.

Fraktion	c in g/Liter	$p \cdot 10^3$	$p/c \cdot 10^3$	Durchschnittsmolekulargewicht	Durchschnittspolymerisationsgrad
			In Tetrahydrofuran		
2	1,98	0,39	0,20	aus lim $p/c = 0{,}15 \cdot 10^{-3}$	
	2,00	0,42	0,21		2600
	2,00	0,42	0,21	164000	
	3,98	1,39	0,35		
	4,00	1,36	0,34		
	4,02	1,32	0,33		
	4,00	1,34	0,33		
	6,00	2,70	0,45		
	7,91	4,44	0,56		
	9,98	6,45	0,65		
			In Dioxan		
2	4,11	0,70	0,17	aus lim	
		0,74	0,18	$p/c = 0{,}165 \cdot 10^{-3}$	2400
	6,00	0,92	0,15		
		0,96	0,16	149000	
	7,97	1,31	0,16		
		1,34	0,17		
3	2,00	1,35	0,67	aus lim	
				$p/c = 0{,}66 \cdot 10^{-3}$	600
	2,01	1,27	0,63	37200	
	3,98	2,72	0,68		

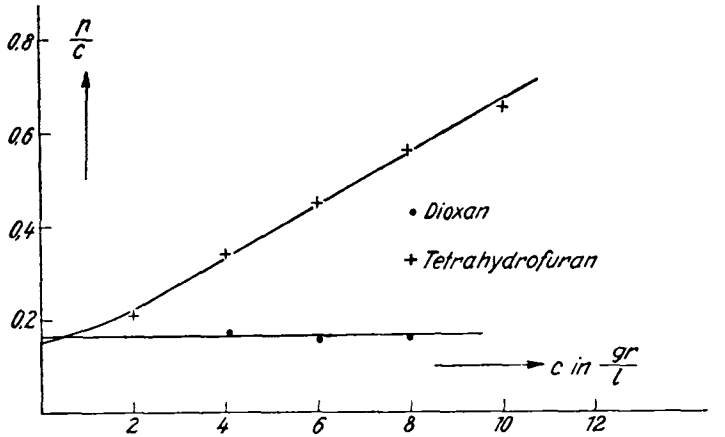


Fig. 5. Bestimmung des lim p/c-Wertes von Polyvinylchlorid V, Fraktion 2.

5. Viscositätsmessungen.

Viscositätsmessungen wurden im Ostwald-Viscosimeter vorgenommen, vorläufig nur in Sollösungen, also in einem Gebiet, in dem die $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werte konstant sind[1]). Es sind nur von wenigen Präparaten die Meßergebnisse angeführt, die zur Genüge die Arbeitsweise zeigen.

Tabelle 16.

Viscositätsmessungen an technischem Polyvinylchlorid II bei 20°.

Fraktion	c in g/Liter	η_r	$\frac{\eta_{sp}}{c}$
	in Dioxan:		
1	1,52	1,081	0,053
	2,01	1,110	0,054
2	2,00	1,106	0,053
3	2,01	1,096	0,047
4	2,00	1,090	0,045
5	2,01	1,053	0,026
	2,01	1,056	0,028
	in Tetrahydrofuran:		
1	0,76	1,086	0,113
	1,00	1,114	0,114
	1,07	1,117	0,109
2	0,98	1,103	0,105
	0,78	1,079	0,102
3	0,98	1,074	0,076
	1,14	1,085	0,075
4	1,96	1,104	0,053
	2,17	1,118	0,054
5	2,14	1,063	0,029
	2,44	1,072	0,029

Weiter wurden Viscositätsmessungen bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt; in Dioxan bei 20 und 60°, in Tetrahydrofuran bei 20 und 50°[2]). Die $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werte in Tetrahydrofuranlösung bei 50° sind ungefähr 10 Proc. niedriger

[1]) Über Viscositätsmessungen in Gellösungen wird später berichtet.

[2]) Da Tetrahydrofuran bei 65° siedet, konnten Viscositätsmessungen in diesem Lösungsmittel nicht bei 60° durchgeführt werden.

als bei 20°. Die Temperaturabhängigkeit[1]) ist also hier die gleiche wie in Lösungen anderer Linearkolloide in guten Lösungsmitteln; dagegen nehmen die $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werte in Dioxan

Tabelle 17.

Viscositätsmessungen an Polyvinylchloriden in Tetrahydrofuran bei 20 und 50°.

Nr. des Produktes	Durchschnitts-polymerisationsgrad osmotisch	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ 20°	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ 50°	$\frac{\frac{\eta_{sp}}{c}\ 50°}{\frac{\eta_{sp}}{c}\ 20°}$
V_2	2500	0,133	0,120	0,90
VI_2	2200	0,140	0,125	0,89
II_1	1640	0,114	0,101	0,89
I_1	1540	0,098	0,087	0,89
I_2	1310	0,097	0,086	0,89
III_1	1270	0,094	0,082	0,87
I_4	560	0,069	0,062	0,90
II_4	450	0,054	0,049	0,91
XI_2	360	0,039	0,034	0,87
II_5	220	0,029	0,027	0,93
XI_3	185	0,026	0,023	0,89

Tabelle 18.

Viscositätsmessungen an Polyvinylchloriden in Dioxan bei 20 und 60°.

Nr. des Produktes	Durchschnitts-polymerisationsgrad osmotisch	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ 20°	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ 60°	$\frac{\frac{\eta_{sp}}{c}\ 60°}{\frac{\eta_{sp}}{c}\ 20°}$
I_1	1550	0,054	0,061	1,13
I_2	1310	0,051	0,061	1,19
$VIII_2$	910	0,053	0,053	1,00
IX_2	610	0,045	0,050	1,11
I_4	560	0,048	0,049	1,02
XV	520	0,045	0,049	1,09
XVI_1	480	0,044	0,041	0,93
$VIII_3$	230	0,032	0,027	0,85
XVI_2	200	0,030	0,025	0,84

[1]) Über die Temperaturabhängigkeit der spezifischen Viscosität vgl. Buch, S. 59.

beim Erwärmen von 20 auf 60° bei den höchstpolymeren Produkten zu. Diese Viscositätserhöhung hängt wahrscheinlich mit einer verstärkten Solvatation der gelösten Moleküle bei höherer Temperatur zusammen.

6. Kryoskopische Untersuchungen.

Anfangs sahen wir die Polyvinylchloride ihres pulvrigen Aussehens und der relativ geringen Viscosität ihrer Lösungen wegen für niedermolekular an; wir glaubten, daß in ihnen hemikolloide Produkte vorlägen, deren Molekulargewichte nach der kryoskopischen Methode zu bestimmen seien. Daher wurde ein zur Lackherstellung geeignetes technisches Produkt in Fraktionen zerlegt und von 3 Fraktionen das Molekulargewicht in verschiedenen Lösungsmitteln bestimmt.

Tabelle 19.

Schmelzpunkte und kryoskopische Konstanten der verwendeten Lösungsmittel.

Lösungsmittel	Schmelzpunkt	Kryoskopische Konstante
Benzol	5,4	5,1
Dioxan	11,0	4,7
Äthylenbromid . . .	9,97	12,5
Naphtalin	80,4	6,9
β-Methylnaphtalin [1] .	35,0	10,5

Fraktion 3 der Tabelle 20 ist in Benzol so leicht löslich, daß auch in diesem Lösungsmittel kryoskopische Bestimmungen durchgeführt werden konnten, während die anderen beiden Fraktionen 2 und 1 in Benzol so schwer löslich waren, daß sich kryoskopische Bestimmungen nicht durchführen ließen.

Die in verschiedenen Lösungsmitteln gefundenen Molekulargewichte sind nicht gleich, sondern schwanken beträchtlich, und zwar sind die Unterschiede bei dem höchstmolekularen Produkt viel größer als bei dem niedermolekularen. Berechnet man aus den Viscositätsmessungen der Spalte 8 und dem Molekulargewicht der Spalte 6 die K_m-Konstante nach Gleichung 1a, so unterscheiden sich diese für ein und dasselbe Produkt sehr stark voneinander.

[1] Nach unveröffentlichten Versuchen von J. Jimenez Herrera.

Tabelle 20.

Kryoskopische Molekulargewichtsbestimmungen und Viscositätsmessungen[1]) an Polyvinylchloriden.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fraktion	Lösungsmittel	Einwage in g	Lösungsmittel in g	ΔT	Mol.-Gew. kryosk.	Mol.-Gew. viscosim.	$\frac{\eta_{sp}}{c_{gm}}$	$\frac{\eta_{sp}}{c}$	$K_m \cdot 10^4$
3	Dioxan	0,1914	36,22	0,016	1550				3,6
		0,1980	36,22	0,018	1490				3,9
	Benzol	0,1533	30,77	0,019	1340				4,2
		0,1719	30,77	0,016	1780	4300	0,56	0,009	3,2
		0,2986	30,77	0,032	1545				3,6
	Methyl-naphtalin	0,2289	31,27	0,033	2330				2,4
		0,3885	31,27	0,057	2290				2,5
2	Dioxan	0,3258	36,22	0,020	2100				6,2
	Äthylen-bromid	0,1634	65,48	0,017	1835				7,1
		0,2087	65,48	0,025	1580				8,2
		0,7337	65,48	0,076	1845	10000	1,30	0,021	7,0
	Methyl-naphtalin	0,4000	31,98	0,078	1685				7,7
	Naphtalin	0,1700	32,90	0,031	1150				11,3
		0,3516	33,86	0,047	1520				8,5
	Dioxan	0,0474	36,22	0,025	246				91,00
		0,1454	36,22	0,023	820				27,00
	Methyl-naphtalin	0,1730	33,05	0,039	1410	18000	2,25	0,036	16,00
	Naphtalin	0,1236	33,71	0,014	1800				12,50
		0,2616	33,71	0,020	2670				8,4
		0,4542	33,71	0,023	4040				5,5

Ermittelt man aus den $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werten (Spalte 9) mittels der graphischen Darstellung (1) den Polymerisationsgrad dieser Polyvinylchloride und weiter daraus das Molekulargewicht dieser Produkte, so ergeben sich die Werte, die in Spalte 7 der Tabelle angegeben sind. Diese sind weit höher als nach der kryoskopischen Methode bestimmte Molekulargewichte. Es liegt also hier ein neuer Fall für das Versagen der kryoskopischen Methode bei makromolekularen Stoffen vor. Die anormalen Erscheinungen liegen in der gleichen

[1]) Die $\frac{\eta_{sp}}{c_{gm}}$ bzw. $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werte wurden in Dioxan bestimmt.

Richtung wie bei den früheren Versuchen; sie treten auch hier beim höchstmolekularen Produkt am stärksten hervor. Weiter werden in niederer Konzentration kleinere Molekulargewichte gefunden als in höherer[1]). Eine Erklärung für diese anormalen Molekulargewichte läßt sich bis jetzt nicht geben; lediglich ersieht man, daß die kryoskopische Methode zur Bestimmung des Molekulargewichts bei makromolekularen Stoffen nur dann angewandt werden darf, wenn die damit erhaltenen Resultate noch durch andere Methoden gesichert sind, wie dies bei den Polyäthylenoxyden der Fall ist[2]).

Tabelle 21.

Kryoskopische Molekulargewichtsbestimmungen an Vinylchlorid-Vinylacetat-Mischpolymerisaten in Dioxan

1	2	3	4	5	6	7	8
Fraktion	Mischpolymerisat in g	Dioxan in g	ΔT in °	Mol.-Gew.	$K_m \cdot 10^4$	$\frac{\eta_{sp}}{c_{gm}}$	Mol.-Gew.*) aus $\frac{\eta_{sp}}{c_{gm}}$
4	0,545	49,45	0,036	1440	5,9	0,85	5 000
	1,004	44,15	0,063	1700	5,0	0,85	
3	0,889	48,50	0,021	4100	3,2	1,32	7 000
	1,072	48,63	0,027	3840	3,4	1,33	
2	0,957	44,81	0,0165	6100	3,3	2,00	20 000
	1,832	44,87	0,0325	5900	3,4	2,00	
1	1,077	43,80	0,015	7700	3,2	2,48	25 000
	1,390	44,82	0,0185	7900	3,2	2,50	
	1,583	44,29	0,026	6450	3,9	2,50	

*) Nach unseren Erfahrungen aus den $\frac{\eta_{sp}}{c_{gm}}$-Werten geschätzt.

Kryoskopische Molekulargewichtsbestimmungen an Mischpolymerisaten von Vinylchloriden und Vinylacetaten wurden

[1]) H. Staudinger u. E. Dreher, A. **517**, 73 (1935); H. Staudinger, W. Kern u. J. J. Herrera, B. **68**, 2346 (1935).

[2]) H. Staudinger u. H. Lohmann, Buch S. 287. Bei den Polyestern wurde das Molekulargewicht nach der kryoskopischen und viscosimetrischen und ferner nach der Endgruppenmethode übereinstimmend gefunden. Vgl. H. Staudinger, B. **67**, 92 (1934); vgl. ferner H. Schmidt, Diss. 1938 u. O. Nuss, Diss. 1939, Freiburg/Br.

früher von S. D. Douglas und W. Stoops vorgenommen[1]). Diese haben dabei anormale niedere Molekulargewichte gefunden; denn die von den Autoren angegebenen K_m-Werte sind viel zu hoch.

Berechnet man aus den Spalten 5 und 6 die $\frac{\eta_{sp}}{c_{gm}}$-Werte, so kann man aus diesen auf Grund unserer Versuche die Molekulargewichte der Spalte 8 abschätzen; man sieht daraus, daß diese technisch wichtigen Mischpolymerisate keine Hemikolloide, sondern Mesokolloide sind.

II. Oxydativ abgebaute Polyvinylchloride.

Um über den Bau der Polyvinylchloride Aufschluß zu erhalten, hauptsächlich um Verzweigungen ihrer Makromoleküle festzustellen, wurden diese Produkte mit Jodwasserstoff und rotem Phosphor reduziert; wir machten dabei keine anderen Beobachtungen als bei der Reduktion des Polyvinylbromids[2]).

Wir untersuchten weiter den oxydativen Abbau der Polyvinylchloride. Kaliumpermanganat, Chromsäure und Wasserstoffsuperoxyd greifen dieselben nicht oder nur sehr langsam an; die Polyvinylchloride sind also fast so beständig wie die Paraffine. Auch bei 10-stündigem Kochen mit konz. Salpetersäure werden diese wenig abgebaut. Nur rauchende Salpetersäure wirkt relativ rasch ein, so daß nach 10—30-stündigem Kochen schon ein merkbarer Abbau festzustellen ist; bei mehrtägigem Kochen geht schließlich das Polyvinylchlorid völlig in Lösung.

Zur Herstellung von Abbauprodukten wurden 50 g technisches Polyvinylchlorid mit 450 ccm rauchender Salpetersäure 20 Stunden am Rückflußkühler gekocht; etwa $^1/_3$ des Produktes bleibt ungelöst. Aus der Säurelösung fällt beim Zusatz von viel Wasser ein Oxydationsprodukt aus; die Hälfte davon ist in Sodalösung löslich und läßt sich aus der Lösung durch Zusatz von Salzsäure wieder ausfällen.

---

[1]) J. of Ind. and Eng. Chem. **28**, 1152 (1936).

[2]) H. Staudinger, M. Brunner u. W. Feisst, Helv. Chim. Acta **13**, 805 (1930).

Diese chlorhaltige organische Säure ist stickstoffhaltig und wurde zur Entfernung von Nitro- oder Nitroso-Gruppen mit 10 Proc. Wasserstoffsuperoxyd 12 Stunden gekocht. Dabei konnte aber der Stickstoffgehalt nicht völlig beseitigt werden. In Tab. 22 sind die Analysendaten von zwei auf gleichem Wege erhaltenen Säuren zusammengestellt.

Tabelle 22.

Analysen der Säuren 1 und 2.

Produkt	C in %	H in %	Cl in %	N in %	O in %
1	38,06	4,41	45,16	1,11	11,26
2	37,50	4,47	44,34	1,18 0,94	12,51
Ber. für Formel $C_{28}H_{42}O_4Cl_{12}$ 0,7 NO_2					
	38,95	4,87	44,90	1,14	10,14

Beide Säuren wurden in Dioxanlösung mit Phenolphtalein als Indicator mit $^1/_{20}$-methylalkoholischer Natronlauge titriert mit folgendem Ergebnis:

Säure	Äquiv.-Gew.	Mittel
1	441; 440; 446; 441	445
2	411; 400; 406	406

Da diese relativ niedermolekularen Säuren in Lösung zur Bildung koordinativer Moleküle neigen und deshalb Molekulargewichtsbestimmungen sowohl nach der kryoskopischen als auch nach der viscosimetrischen Methode zu unrichtigen Ergebnissen führen, wurden diese Dicarbonsäuren durch Behandeln mit Diazomethan in Dioxanlösung in ihre Methylester übergeführt; dieselben haben die Zusammensetzung der Tab. 23 (S. 187).

Aus dem Methoxylgehalt der Ester läßt sich ihr Durchschnittsmolekulargewicht berechnen, ebenso wurde dasselbe nach der kryoskopischen Methode in Dioxan und β-Methylnaphtalin bestimmt.

Tabelle 23.

Analyse der Dimethylester.

Produkt	C in %	H in %	Cl in %	N in %	OCH_3 in %
1	40,07	4,89	43,82	1,51 1,30	6,21
2 [1])	39,10	4,79	42,71	1,58 1,36	6,86
Ber. für $C_{29}H_{41}O_5Cl_{11}(NO)$					
	39,85	4,69	44,5	1,60	9,16

Tabelle 24.

Kryoskopische Molekulargewichtsbestimmungen an den Dimethylestern der chlorierten Dicarbonsäuren.

Nr.	Lösungsmittel	Einwage in g	Lösungsmittel in g	ΔT in °	Mol.-Gew.
1	Dioxan	0,2422	33,00	0,040	863
		0,1410	33,00	0,023	873
	β-Methylnaphtalin. .	0,2140	26,84	0,096	872
2	Dioxan	0,2769	31,00	0,057	744
	β-Methylnaphtalin. .	0,2604	26,77	0,141	736

Tabelle 25.

Viscositätsmessungen an Lösungen der Methylester der Dicarbonsäuren.

Produkt	Lösungsmittel	Konzentration in g pro Liter	η_{sp}	$\frac{\eta_{sp}}{c}$	Kettengliederzahl	Mol.-Gew.
Ester 1	Aceton	16,3	0,060	0,0037	39	
		18,5	0,066	0,0036	39	1130
		20,3	0,074	0,0036	39	
Ester 1	Dioxan	19,5	0,078	0,0040	40	
		20,0	0,081	0,0040	40	1150
Ester 2	Aceton	21,5	0,068	0,0031	34	
		31,1	0,101	0,0032	35	980
Ester 2	Dioxan	20,2	0,072	0,0036	35	
		29,1	0,109	0,0037	36	1020

[1]) Wiederholung des Versuches 1.

Weiter wurden an Lösungen dieser Methylester in Aceton und Dioxan Viscositätsmessungen vorgenommen und die Kettengliederzahl (n) nach der Formel

$$(3)\quad \frac{\eta_{sp}}{c} = K_{äq} \cdot n$$

ermittelt. Die $K_{äq}$-Konstante[1]) für Lösungen von Kohlenwasserstoffen in Aceton beträgt $0{,}9.10^{-4}$, für solche in Dioxan etwa 1.10^{-4}. Aus der Zahl der Kettenglieder (n) wurde durch Multiplikation mit dem Durchschnittskettenäquivalentgewicht 29 das Molekulargewicht berechnet.

Nach der folgenden Tabelle stimmen die nach den verschiedenen Methoden erhaltenen Werte für das Molekulargewicht dieser chlorhaltigen zweibasischen Säure und ihrer Methylester ungefähr miteinander überein. Bei diesen Produkten ist also zum Unterschied von den höhermolekularen die kryoskopische Methode zur Bestimmung des Durchschnittsmolekulargewichtes brauchbar.

Tabelle 26.

Vergleich der nach verschiedenen Methoden bestimmten Molekulargewichte der Dicarbonsäuren und ihrer Methylester.

Produkt	Titration	Kryoskopie	Methoxylgehalt	Viscosität des Methylesters
1	900	870	1000	1050
2	810	740	900	960

III. Chloriertes Polyvinylchlorid.

1. Löslichkeit.

Das Polymerisationsprodukt des asymmetrischen Dichloräthylens ist ein weißes Pulver, das sich wegen seiner geringen Löslichkeit zur Untersuchung wenig eignet. Läßt man dagegen auf Polyvinylchloride in Tetrachloräthan bei 60—100° Chlor einwirken, so erhält man chlorierte Polyvinylchloride, die nach folgender Analyse auf 3 Polyvinylchloridmoleküle ein weiteres Chloratom enthalten und viel leichter löslich sind als die ursprünglichen Polyvinylchloride.

[1]) H. Staudinger, Elektrochemie **40**, 434 (1934).

Tabelle 27.

Analysen von Fraktionen eines chlorierten Polyvinylchlorids (technisches Produkt).

Fraktion	C in %	H in %	Cl in %
Ber. für 1 Chlor auf 3 Mol Vinylchlorid:			
	32,4	3,6	64,0
Gef.:			
1	32,17	3,65	63,79
2	32,24	3,36	63,44
3	31,63	3,57	64,29

2. Abbau des Polyvinylchlorids beim Chlorieren.

Um Polyvinylchlorid zu chlorieren, wurde[1]) in eine 3-proc. Lösung von Polyvinylchlorid (Polymerisationsgrad 1350) in Tetrachloräthan bei 60° 12 Stunden Chlor eingeleitet. Der Chlorgehalt steigt dabei von 55,0 Proc. des Ausgangsmaterials auf 66 Proc. Sowohl von dem Ausgangsmaterial wie von dem chlorierten Produkt wurde der Polymerisationsgrad nach der osmotischen Methode bestimmt. Weiter wurden Viscositätsmessungen in Dioxan und Tetrahydrofuran durchgeführt und der Polymerisationsgrad mit der Konstante $2 \cdot 10^{-4}$ berechnet. Berechnet man aus Viscositätsmessungen in Dioxan den Polymerisationsgrad, so sollte der des chlorierten Produktes höher sein als der des nicht chlorierten. Tatsächlich ist jedoch beim Chlorieren ein erheblicher Abbau des Polyvinylchlorids eingetreten, möglicherweise durch Spaltung der Ketten[2]). Daß die $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werte des chlorierten Produktes in Dioxan höher sind als die des Ausgangsmaterials liegt nur daran, daß dieses leichter löslich ist und deshalb höherviscose Lösungen liefert. Der K_m-Wert des chlorierten Produktes ist in Dioxan doppelt so hoch als der des nicht chlorierten.

[1]) Nach Vorschrift und Angaben der Patente: Franz. Patent 755048 (1933), 758454 (1934); Engl. Patent 401200 (1933).

[2]) Auch eukolloides Polystyrol wird durch Einwirkung von Brom sehr stark abgebaut, vgl. H. Staudinger u. W. Heuer, Buch, S. 217.

Tabelle 28.

Veränderungen des Polymerisationsgrades eines Polyvinylchlorids beim Chlorieren.

Durchschn. Pol.-Grad osmotisch	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ in Dioxan	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ in Tetrahydrofuran	Kettenlänge visc. in Dioxan	Kettenlänge visc. in Tetrahydrofuran	Polym.-Grad osm. / Kettenlänge visc. in Dioxan	Polym.-Grad osm. / Kettenlänge visc. in Tetrahydrofuran	$K_m \cdot 10^4$ in Dioxan	$K_m \cdot 10^4$ in Tetrahydrofuran
				Unchloriert:				
1350	0,053	0,097	265	485	5,1	2,8	0,40	0,72
				Chloriert:				
800	0,077	0,082	385	410	2,1	1,95	0,96	1,02

3. Osmotische und viscosimetrische Messungen an chlorierten Polyvinylchloriden

Zu diesem Zweck wurde ein technisches Produkt durch stufenweise Zugabe von Methanol zu seiner Lösung in Dioxan in einzelne Fraktionen unterteilt.

Tabelle 29.

Osmotische Messungen an chlorierten Polyvinylchloriden in Dioxan bei 27° C.

1	2	3	4	5	6
c in g/Liter	$p \cdot 10^3$	$p/c \cdot 10^3$	s	Durchschnitts-Mol.-Gew.	Durchschnitts-polym.-Grad
			I. Fraktion:		
1,82	0,26	0,14	0,1470	235 000	
4,01	0,67	0,17	0,1010	247 000	
6,08	1,23	0,20	0,0800	236 000	
7,98	1,83	0,23	0,0679	234 000	3 100
10,00	2,60	0,26	0,0595	228 000	
11,95	3,47	0,29	0,0528	230 000	
12,00	3,59	0,30	0,0520	219 000	
				232 700	
			II. Fraktion:		
2,25	0,79	0,35	0,0945	89 200	
4,00	1,56	0,39	0,0727	88 900	
6,10	2,60	0,43	0,0595	90 500	1 180
8,00	3,82	0,48	0,0510	87 100	
10,00	5,24	0,52	0,0450	85 400	
				88 300	

Tabelle 29 (Fortsetzung).

1	2	3	4	5	6
c in g Liter	$p \cdot 10^3$	$p/c \cdot 10^3$	s	Durchschnitts-Mol.-Gew.	Durchschnitts-polym.-Grad
			III. Fraktion:		
2,06	1,04	0,52	0,0850	59 000	800
4,03	2,32	0,57	0,0620	57 000	
6,00	3,61	0,60	0,0520	59 400	
7,98	5,15	0,64	0,0450	59 500	
10,03	6,75	0,67	0,0405	61 400	
12,05	8,54	0,71	0,0370	62 700	
				59 800	

Da die chlorierten Polyvinylchloride in organischen Lösungsmitteln gut löslich sind, also auch gut solvatisiert werden, so nehmen die p/c-Werte mit steigendem Molekulargewicht wie bei allen Linearkolloiden stark zu. Bei polymerhomologen Produkten gleicher Zusammensetzung, also gleichen Chlorgehaltes, lassen sich auf Grund der Schulzschen Formel[1]) die s-Werte bestimmen und daraus Molekulargewichte berechnen, wie die Tab. 29 zeigt.

Viscositätsmessungen wurden bei 20° in Dioxan und Tetrahydrofuran im Ostwaldviscosimeter vorgenommen.

Tabelle 30.

Viscositätsmessungen an chlorierten Polyvinylchloriden bei 20°

Fraktion	Konzentration in g pro Liter	η_r	$\frac{\eta_{sp}}{c}$
	In Dioxan		
1	1,93	1,229	0,119
	1,12	1,132	0,118
2	1,50	1,123	0,082
	1,02	1,085	0,083
3	3,15	1,193	0,061
	3,06	1,194	0,063
	In Tetrahydrofuran		
1	0,65	1,082	0,127
	0,62	1,080	0,129
3	1,13	1,077	0,068
	1,13	1,080	0,071
	1,21	1,085	0,070

[1]) G. V. Schulz, Ph. Ch. (A) **176**, 317 (1936).

Die $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werte eines Produktes sind in beiden Lösungsmitteln nur wenig verschieden; denn die gechlorten Polyvinylchloride sind in Dioxan und in Tetrahydrofuran ebenso leicht löslich. Beim Erwärmen von 20° auf 50° bzw. 60° nehmen die $\frac{\eta_{sp}}{c}$-Werte um etwa 10 Proz. ab; die Temperaturabhängigkeit der Lösungen dieser gut löslichen gechlorten Polyvinylchloride ist also dieselbe, wie die von Lösungen anderer gut löslicher makromolekularer Stoffe.

Tabelle 31.

Viscositätsmessungen an chlorierten Polyvinylchloriden in Dioxan bei 20° und 60°.

Produkt	Durchschnitts-polymerisationsgrad osmotisch	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ bei 20°	$\frac{\eta_{sp}}{c}$ bei 60°	$\frac{\frac{\eta_{sp}}{c} \text{ bei } 60°}{\frac{\eta_{sp}}{c} \text{ bei } 20°}$
I_1	3100	0,129	0,119	0,92
II_1	2800	0,136	0,121	0,89
III_1	1270	0,109	0,099	0,91
III_2	980	0,102	0,092	0,90
I_3	800	0,070	0,064	0,91
II_2	760	0,096	0,088	0,91

IV. Mischpolymerisate aus Vinylchlorid und Vinylacetat.

1. Herstellung und Analysen.

Mischpolymerisate aus Vinylchlorid und Vinylacetat spielen in der Technik eine große Rolle; denn die Eigenschaften solcher Kunststoffe lassen sich weitgehend verändern, je nachdem die einen oder anderen Grundmoleküle in größerer Zahl in das Makromolekül eingebaut werden. Diese Mischpolymerisate werden hauptsächlich als Lacke verwendet[1]). Wir stellten solche Mischpolymerisate mit wechselndem Vinylacetatgehalt hauptsächlich in der Erwartung her, durch Oxydation derselben Aufschluß über die Bindungsart der Grundmoleküle zu erhalten und eventuell

[1]) Vgl. hierzu E. Ellis, a. a. O. **1935**, 1016; G. O. Curme, Jr. u. S. D. Douglas, J. of the Ind. and Eng. Chem. **28**, 1123 (1936).

Verzweigungen in den Molekülen nachweisen zu können. Wir hofften nämlich, durch Abbau der Mischpolymerisate bzw. ihrer Verseifungsprodukte gechlorte Säuren von bekanntem Bau erhalten zu können. Diese Mischpolymerisate wurden jedoch bei der Oxydation mit Salpetersäure vollständig zerstört und niedermolekulare einheitliche Spaltstücke wurden bisher nicht isoliert.

Zur Herstellung von Mischpolymerisaten wurde Vinylchlorid und Vinylacetat in verschiedenen Verhältnissen gemischt und mit Benzoylperoxyd als Katalysator durch Belichten polymerisiert. Die Röhren wurden dabei durch Wasser von etwa 20° gekühlt; während sich bei der Polymerisation von reinem Polyvinylchlorid unter diesen Bedingungen das Polymerisat als feste Masse ausscheidet, wird hier die Flüssigkeit viscoser und geht allmählich in eine feste glasige Masse über.

Ein Mischpolymerisat aus Vinylchlorid und Vinylacetat 1:1 wurde durch stufenweise Zugabe von Methanol zur Acetonlösung in einzelne Fraktionen zerlegt. Das schwer lösliche hochmolekulare Produkt hat dabei einen größeren Chlorgehalt als das leichter lösliche. In keinem der ausgefällten Polymerisationsprodukte ist das Verhältnis von Vinylchlorid zu Vinylacetat 1:1 (vgl. Tab. 32).

Tabelle 32.

Analysen der Mischpolymerisate.

Nr. des Produktes	C in %	H in %	Cl in %	Verhältnis von Vinylchlorid zu Vinylacetat	Grundmolekulargewicht
I_1	43,26	5,88	39,85	9:3	68,4
I_2	44,49	5,60	38,20	7:3	69,5
I_3	46,48	5,58	31,35	5:3	71,3
II_2	52,86	6,81	19,58	5:7	76,2

2. Osmotische und viscosimetrische Bestimmungen an Mischpolymerisaten aus Vinylchlorid und Vinylacetat.

Die Messungen in Dioxan ergaben ungefähr dasselbe Bild wie bei den chlorierten Polyvinylchloriden. Wegen

ihrer guten Solvatation nehmen die p/c-Werte mit steigender Konzentration stark zu. Auch hier wurden auf Grund der Schulzschen Formel die s-Werte bestimmt, und daraus die Molekulargewichte berechnet, wie folgende Tab. 33 zeigt.

Tabelle 33.

Osmotische Messungen an Mischpolymerisaten aus Vinylchlorid–Vinylacetat in Dioxan bei 27°.

c in g/Liter	$p \cdot 10^3$	$p/c \cdot 10^3$	s	Durchschn.-Mol.-Gew. aus s-Werten	Durchschnitts-Polym.-Grad
			I. Fraktion eines Mischpolymerisates.		
2,01	0,52	0,26	0,1025	119 800	
4,04	1,21	0,30	0,0739	117 100	
6,00	2,01	0,33	0,0601	114 800	1700
8,04	2,98	0,37	0,0519	113 500	
10,10	4,10	0,40	0,0460	114 100	
				116 000	
			II. Fraktion eines Mischpolymerisates.		
2,00	0,78	0,39	0,0878	76 000	
4,00	1,73	0,43	0,0640	76 500	
6,08	2,80	0,46	0,0530	78 700	1100
8,00	3,99	0,50	0,0460	77 100	
9,98	5,39	0,54	0,0397	75 500	
				77 000	
			III. Fraktion eines Mischpolymerisates.		
2,05	0,93	0,45	0,0868	66 000	
4,00	1,96	0,49	0,0613	66 500	
6,00	3,17	0,53	0,0503	66 600	950
7,97	4,63	0,58	0,0434	64 700	
10,00	6,00	0,60	0,0390	67 200	
12,42	8,11	0,65	0,0347	66 300	
				66 450	
			II. Fraktion eines Mischpolymerisates.		
2,00	0,70	0,35	0,0910	86 100	
4,00	1,54	0,38	0,0665	87 100	1150
8,06	3,62	0,45	0,0480	89 300	
				87 300	

In Fig. 6 ist die Beziehung zwischen den s-Werten und der Konzentration aufgetragen[1]). Viscositätsmessungen

[1]) Merkwürdigerweise gilt hier die Schulzsche Formel, obwohl keine polymeranalogen Produkte vorliegen, wie aus der Tab. 32 hervorgeht.

wurden bei 20° in Dioxan im Ostwaldviscosimeter vorgenommen, deren Resultate in der folgenden Tab. 34 zusammengestellt sind.

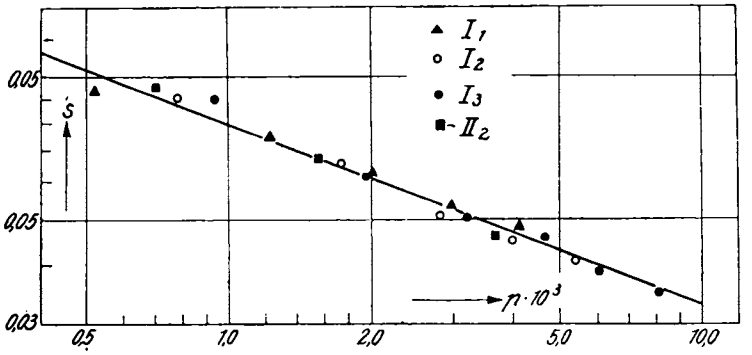


Fig. 6.

Abhängigkeit des spezifischen Volumens vom osmotischen Druck.

Tabelle 34.

Viscositätsmessungen an Mischpolymerisaten aus Vinylchlorid-Vinylacetat in Dioxan bei 27°.

Produkt	c in g/Liter	η_r	$\frac{\eta_{sp}}{c}$
I_1	1,11	1,111	0,100
	1,38	1,134	0,097
I_2	1,02	1,081	0,079
	1,37	1,107	0,078
I_3	1,17	1,087	0,074
	1,63	1,120	0,074
II_2	0,91	1,062	0,068
	1,44	1,100	0,069

Synthese des Rhodoporphyrin-γ-carbonsäureanhydrids und über synthetische Rhodine und Verdine [1];

von *Hans Fischer* und *Carl Gottfried Schröder*.

[Aus dem Organisch-chemischen Institut der Technischen Hochschule München.]

(Eingelaufen am 26. August 1939)

Trotz verschiedener Untersuchungen über synthetische Rhodine und Verdine sind noch zahlreiche Fragen zu beantworten; u. a. war auffallend die Tatsache des Bestehens zweier isomerer Mesorhodine IX, über die vor kurzem berichtet wurde. Die beiden Mesorhodine konnten in zwei isomere Verdine übergeführt werden, die sich scharf in den Eigenschaften unterschieden [2]). Schon früher konnte bei der Oxydation von Roh-Mesorhodin ein Gemisch von isomeren Porphyrinen isoliert werden, was bereits für das Vorhandensein zweier Rhodine sprach [3]).

Neuerdings gelang es nun, Mesoverdin II auf oxydativem Wege in das grüne Rhodoporphyrin-γ-carbonsäureanhydrid überzuführen. Schmelz- und Mischschmelzpunkt waren identisch mit denen des Chlorophyllabbauprodukts. Da die Totalsynthese von Mesoporphyrin IX bereits vollzogen ist, bedeutet diese Überführung die Synthese dieses wichtigen Chlorophyll-porphyrins.

Mesoverdin II enthält den Ringschluß von der 6-Stellung zur γ-Methinbrücke, und demgemäß wird hier bei der Oxydation das „echte" Chlorophyll-porphyrin erhalten, während früher bei Verwendung von Mesoverdin I der isomere Körper isoliert wurde. Beim Mesoverdin I ist die Brückenbindung von der 7-Stellung aus zur γ-Methinbrücke

[1]) 92. Mitteilung zur Kenntnis der Chlorophylle; 91. Mitteilung im Druck.

[2]) H. Fischer u. C. G. Schröder, A. **537**, 250 (1939).

[3]) H. Fischer u. J. Ebersberger, A. **509**, 24 (1934).

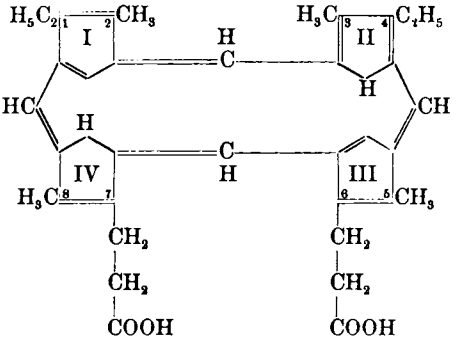
geschlagen. Die beiden isomeren Rhodo-porphyrin-γ-carbonsäure-anhydride geben in der Mischprobe eine entscheidende Depression.

Mit diesen Feststellungen ist definitiv bewiesen, daß bei der Rhodinbildung einmal der Propionsäurerest in 6-Stellung und einmal der in 7-Stellung die Ursache zur Rhodin- bzw. Verdinbildung ist.

Auffallend war, daß bei der Rhodinbildung die Bildung zweier isomerer Rhodine beschränkt schien auf Mesoporphyrin IX. Wie schon seinerzeit hervorgehoben, konnte die Ursache hierfür die unsymmetrische Konstitution des Mesoporphyrin IX sein. Dies wurde durch die weitere Untersuchung durchaus bestätigt.

Mesoporphyrin XIII (Formel I) unterscheidet sich vom Isomeren IX dadurch, daß es im Kern I in 1-Stellung den Äthylrest und in 2 den Methylrest trägt, während bei IX die umgekehrte Anordnung besteht. Alle übrigen Gruppen, insbesondere auch die Propionsäurereste sind vollkommen

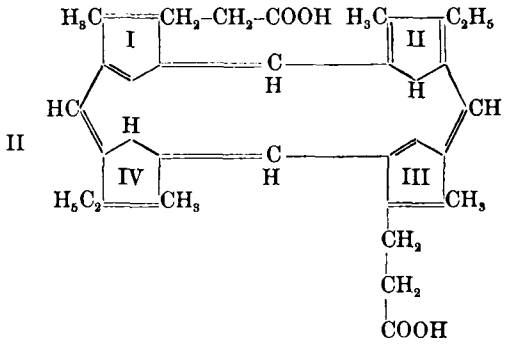
I



analog angeordnet. Hier war nun kein Anhaltspunkt gegeben für die Entstehung von Isomeren. Das Rhodin erwies sich als einheitlich, ebenso das aus dem Rohprodukt gewonnene Mesoverdin.

Offensichtlich ist für einheitliche Rhodinbildung in erster Linie verantwortlich die symmetrische Anordnung der Substituenten. Die Reihenfolge der Doppelbindungen spielt anscheinend keine Rolle, vielleicht tritt auch — wie bereits früher vermutet — die Bildung eines Gleichgewichts ein,

weshalb bei symmetrischer Struktur Isomere nicht auftreten. Diese Vermutung wird weiter bestärkt durch das Verhalten von Mesoporphyrin II (Formel II):



Hier ist wiederum die Möglichkeit gegeben zur Entstehung zweier isomerer Rhodine. Wenn nämlich der Propionsäurerest in 2-Stellung die Rhodinreaktion eingeht, steht in Nachbarstellung der Ring II, ein Pyrrolring. Wenn aber der Propionsäurerest in 6-Stellung die gleiche Reaktion gibt, so befindet sich in Nachbarstellung ein Maleinimidkern (IV). Theoretisch könnten also Valenztautomere auftreten. Das Experiment zeigte aber keinen Anhaltspunkt für das Auftreten von isomeren Rhodinen. Auch die Verdinbildung erfolgt durchaus glatt, und das erhaltene Verdin war einheitlich. Ein Versuch, durch chromatographische Reinigung eine Trennung in Isomere herbeizuführen, fiel negativ aus. Hiermit ist der experimentelle Beweis geliefert, daß eine verschiedene Anordnung der Doppelbindungen keine Veranlassung zur Bildung von Isomeren gibt, vielmehr entsteht die durch die Stabilitätsverhältnisse begünstigte Form.

Die Untersuchung des Mesoporphyrin II bzw. seines Rhodins hatte auch noch nach einer anderen Richtung hin ein großes Interesse. Mesoporphyrin II leitet sich von Ätioporphyrin I ab, von dem zahlreiche „natürliche" Porphyrine — insbesondere Uro- und Koproporphyrin — abstammen. Diese entsprechen in der Konstitution also nicht dem gewöhnlichen Blutfarbstoff, sondern müssen durch eine primäre Synthese entstehen. Es schien möglich, daß im

gewöhnlichen Blutfarbstoff bereits ein Gemisch zweier isomerer Hämine enthalten sei. Vor kurzem schien auch zum ersten Male ein experimenteller Anhaltspunkt für eine solche Annahme gegeben zu sein, indem Mesoporphyrin II-ester mit einem durch Chromatographie gereinigten „natürlichen" Mesoester nur eine minimale Schmelzpunktsdepression gab[1]). Im weiteren Verfolg konnten diese Resultate nicht bestätigt werden[2]).

Wenn nun im natürlichen Mesoporphyrin IX das Isomere II enthalten war, dann sollte auch das aus letzterem bereitete Mesorhodin bzw. -verdin mit einem der Isomeren aus IX identisch sein. Das war nicht der Fall, auch hier waren scharfe und eindeutige Schmelzpunktsdepressionen vorhanden. II ist hiernach als Komponente des „natürlichen" Mesoporphyrins IX ausgeschlossen.

Endlich wurde synthetisches Mesoporphyrin IX gleichfalls auf Rhodin und Verdin verarbeitet. Auch hier ergaben sich wieder die gleichen Verhältnisse wie beim „natürlichen" Mesoporphyrin IX. Es muß also Mesoporphyrin IX aus Blutfarbstoff als einheitlich betrachtet werden.

Herrn Léon Biot sind wir zu großem Dank verpflichtet für die präparative Gewinnung einer größeren Menge von Mesoporphyrin II.

Versuche.

Oxydation von analytischem Mesoverdinester II[3]).

50 mg Verdinester werden in 100 ccm Aceton gelöst, in Eiswasser auf 0° abgekühlt und mit fein zerriebenem Permanganat versetzt. Nach häufigem Umschütteln ist in 1 Stunde der Verdinstreifen bei 700 mμ verschwunden. Es wird nun in 2 Liter Äther gegeben und wie früher beschrieben (a. a. O., S. 284) aufgearbeitet. Aus Äther krystallisiert das grüne Anhydrid in zu Büscheln vereinigten Rhomben aus. Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Chloroform-

[1]) H. **259**, I (1939).

[2]) Bei diesen Untersuchungen waren auch die Herren Eckoldt und Grumme beteiligt, hierüber erfolgt später Mitteilung.

[3]) A. **537**, 268 (1939).

Methanol wurde es in feinen Nadeln vom Schmelzp. 250—251° (vorher Sintern) erhalten.

Mit Rhodoporphyrin-γ-carbonsäure-anhydrid aus Phäoporphyrin a_5[1]), das den Schmelzp. 260° (ab 250° starkes Sintern) zeigt, ergab die Mischprobe keine Depression (Mischschmelzp. 251°). Mit Iso-rhodoporphyrin-γ-carbonsäure-anhydrid (Schmelzp. 248°) aus dem Mesoverdin I gewonnen (a. a. O., S. 285), wurde bei der Mischprobe eine Depression auf 225 bis 228° beobachtet.

Mesorhodin XIII.

Mesoporphyrin XIII (1,4-Diäthyl-2,3,5,8-tetramethylporphin-6,7-dipropionsäure) wird in bekannter Weise der Rhodinreaktion unterzogen. Der erhaltene Rhodinester krystallisiert in feinen Prismen und zeigt schon nach einmaligem Umkrystallisieren den konstant bleibenden Schmelzp. 275°. Zur Analyse wurde aus Pyridin umkrystallisiert.

4,420 mg Subst. (bei 80° i. Hochv. getr.): 12,062 mg CO_2, 2,660 mg H_2O. — 3,830 mg Subst.: 0,340 ccm N_2 (24°, 723 mm). — 4,775 mg Subst.: 1,837 mg AgJ.

$C_{35}H_{38}N_4O_3$	Ber.	C 74,70	H 6,81	N 9,96	OCH_3	5,42
	Gef.	„ 74,43	„ 6,73	„ 9,76	„	5,08.

Mesoverdin XIII.

Mesorhodin XIII wird mit Semicarbazid-Chlorhydrat in bekannter Weise in das Verdin übergeführt (a. a. O., S. 274). Der erhaltene Ester krystallisiert in schönen Prismen vom Schmelzp. 241°.

3,890 mg Subst. (bei 80° i. Hochv. getr.): 10,700 mg CO_2, 2,170 mg H_2O. — 2,380 mg Subst.: 0,225 ccm N_2 (24°, 715 mm). — 3,281 mg Subst.: 1,383 mg AgJ.

$C_{35}H_{36}N_4O_3$	Ber.	C 74,96	H 6,48	N 10,00	OCH_3	5,53
	Gef.	„ 75,02	„ 6,24	„ 10,22	„	5,44.

Mesoporphyrin II-dimethylester[2]).

Der synthetisch hergestellte Ester zeigte einen Schmelzpunkt von 225—226°. In der Mischprobe mit Meso IX-Rohprodukt (206°) trat eine Schmelzpunktsdepression auf 195° ein. Die Mischprobe mit reinstem Meso IX (211°) ergab eine Schmelzpunktsdepression auf 205°.

---

[1]) H. Fischer, O. Süss u. G. Klebs, A. **490**, 56 (1931).

[2]) H. Fischer, H. Friedrich, W. Lamatsch u. K. Morgenroth, A. **466**, 177 (1928).

Mesorhodinester II.

Mesoporphyrin II (1,3,5,7-Tetramethyl-4,8-diäthyl-porphin-2,6-dipropionsäure-dimethylester) wurde der Rhodinreaktion unterworfen. Der erhaltene Ester krystallisiert je nach Lösungsmittel in Nadeln oder großen, spitz zulaufenden Platten aus. Zur Analyse wurde das Rhodin aus Aceton umkrystallisiert und in den charakteristischen Platten vom Schmelzp. 240° (vorher Sintern) erhalten.

3,510 mg Subst. (bei 80° i. Hochv. getr.): 9,670 mg CO_2, 2,060 mg H_2O. — 3,061 mg Subst.: 0,269 ccm N_2 (23°, 723 mm). — 3,635 mg Subst.: 1,652 mg AgJ.

$C_{35}H_{38}N_4O_3$	Ber.	C 74,70	H 6,81	N 9,96	OCH_3 5,42
	Gef.	„ 75,14	„ 6,57	„ 9,64	„ 5,45.

Mit Mesorhodin IX vom Schmelzp. 254° wurde bei der Mischprobe eine Schmelzpunktsdepression auf 228° erhalten.

Verdin aus Mesorhodin II.

In bekannter Weise wurde aus Mesorhodinester II das Verdin dargestellt. Es wurde in prächtigen Rhomben vom Schmelzp. 222—223° (vorheriges Sintern) erhalten. Zur Analyse wurde aus Aceton umkrystallisiert.

3,480 mg Subst. (bei 80° i. Hochv. getr.): 9,480 mg CO_2, 1,972 mg H_2O. — 4,010 mg Subst.: 0,366 ccm N_2 (21°, 723 mm).

$C_{35}H_{36}N_4O_3$	Ber.	C 74,96	H 6,48	N 10,00
	Gef.	„ 74,30	„ 6,34	„ 10,08.

Mit analytischem Mesoverdinester I vom Schmelzp. 252° wurde bei der Mischprobe eine Depression auf 218—220° beobachtet, mit analytischem Mesoverdinester II vom Schmelzp. 228° eine Depression auf 205°.

Mesorhodin und Verdin aus synthetischem Mesoporphyrin IX.

0,25 g synthetisches Mesoporphyrin IX wurde mit Oleum auf Mesorhodin verarbeitet. Nach je 3-maligem Umkrystallisieren aus Chloroform-Methanol und Pyridin-Methanol zeigte es den Schmelzp. 245°. Mit analytischem Mesorhodin IX, welches nach 12—15-maligem Umkrystallisieren aus Pyridin-Methanol den Schmelzp. 254° ergibt, wurde bei der Mischprobe der Schmelzp. 248° erhalten.

150 mg von dem synthetischen Mesorhodin IX-Rohprodukt (Schmelzp. 238°) wurde mit Semicarbazid-Chlorhydrat

auf Verdin verarbeitet und durch fraktionierte Krystallisation und anschließende Adsorptionsanalyse in die beiden Komponenten I und II getrennt (a. a. O., S. 268). Der synthetische Mesoverdinester I wurde nach 5-maligem Umkrystallisieren aus Pyridin-Methanol in unregelmäßig begrenzten Plättchen vom Schmelzp. 245° erhalten. Mit analytischem Material vom Schmelzp. 252° war keine Schmelzpunktsdepression zu beobachten. Der synthetische Mesoverdinester II wurde nach 3-maligem Umkrystallisieren aus Chloroform-Methanol in blauglänzenden Spießen vom Schmelzp. 220° erhalten. Mit analytischem Material vom Schmelzp. 228° trat keine Schmelzpunktsdepression ein.

Synthese von 1,3,5,7-Tetramethyl-2,4-diäthyl-6-γ-äthan-porphin-8-propionsäure-rhodin.

Vor kurzem[1]) berichteten wir über die Synthese eines isomeren Desoxophyllerythrins, die 1,3,5,7-Tetramethyl-2,4-diäthyl-6-γ-äthan-porphin-8-propionsäure, und ihre Überführung in das entsprechende Rhodin. Fräulein Dipl.-Ing. Gangl hat diese Synthese nochmals nachgearbeitet und bei der Porphyrinsynthese beobachtet, daß hierbei als Nebenprodukt bereits das a. a. O., S. 41 erwähnte, isomere Phylloerythrin entsteht. Die Rhodinüberführung vollzog sich entsprechend der gegebenen Vorschrift ohne Schwierigkeiten. Umkrystallisiert wurde aus Pyridin-Methylalkohol. Nadelförmige Prismen. Die Analyse hatte folgendes Ergebnis:

4,176 mg Subst.: 12,080 mg CO_2, 2,480 mg H_2O. — 2,455 mg Subst.: 0,248 ccm N_2 (23°, 723 mm).

$C_{33}H_{34}N_4O$ (502,3)	Ber.	C 78,84	H 6,82	N 11,15
	Gef.	„ 78,89	„ 6,65	„ 11,08.

Der Schmelzpunkt lag scharf bei 274°.

[1]) H. Fischer u. W. Rose, A. **519**, 40—42 (1935).

(Abgeschlossen am 3. Oktober 1939.)

Verantwortlich für die Redaktion: Prof. Dr. H. Wieland, München; für den Anzeigenteil: Anton Burger, Berlin-Tempelhof — Verlag Chemie, G. m. b. H., Berlin W 35
Zur Zeit ist Anzeigen-Preisliste Nr. 3 gültig — Printed in Germany
Druck: Metzger & Wittig, Leipzig

Zum Abbau von Bernsteinsäure, Äpfelsäure und Citronensäure durch Hefe;

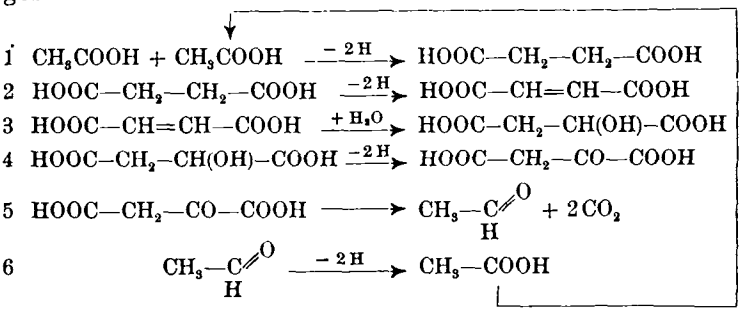
von *Feodor Lynen* und *Nevhiz Neciullah.*

Mit 1 Figur im Text.

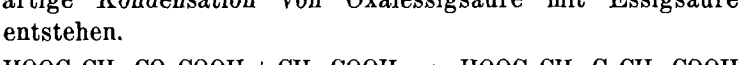
[Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München.]

(Eingelaufen am 23. August 1939.)

Wieland und Sonderhoff haben beim oxydativen Abbau der Essigsäure durch verarmte Hefe Bernsteinsäure und Citronensäure isolieren können[1]). Sie sehen in der Bernsteinsäure das primäre Dehydrierungsprodukt aus 2 Molekeln Essigsäure, das dann nach folgendem Schema weiter abgebaut wird.


1 CH3COOH + CH3COOH −2H HOOC–CH2–CH2–COOH
2 HOOC–CH2–CH2–COOH −2H HOOC–CH=CH–COOH
3 HOOC–CH=CH–COOH +H2O HOOC–CH2–CH(OH)–COOH
4 HOOC–CH2–CH(OH)–COOH −2H HOOC–CH2–CO–COOH
5 HOOC–CH2–CO–COOH CH3–C(=O)H + 2CO2
6 CH3–C(=O)H −2H CH3–COOH

Die Citronensäure soll als Nebenprodukt durch aldolartige Kondensation von Oxalessigsäure mit Essigsäure entstehen.



Diese Deutung der Versuchsergebnisse traf jedoch auf gewisse Schwierigkeiten. Wie Wieland und Sonderhoff zeigen konnten, wird zugesetzte Bernsteinsäure von verarmter Hefe zu langsam dehydriert, um als Zwischenprodukt

[1]) H. Wieland u. R. Sonderhoff, A. **499**, 213 (1932).

bei der raschen Oxydation von Essigsäure auftreten zu können[1]). Die Autoren haben zur Erklärung dieser Verhältnisse angenommen, daß die Bernsteinsäure, die durch Dehydrierung aus der Essigsäure entsteht „in statu nascendi" noch eine beträchtliche Aktivierungsenergie besitzt und infolgedessen von der Bernsteinsäuredehydrase rascher umgesetzt wird als die Bernsteinsäure, die von außen zugesetzt wird[1]).

Derselbe aktivierte Zustand wurde auch für die Essigsäure- und Oxalessigsäuremolekeln angenommen, welche die Kondensation zu Citronensäure eingehen, da auch diese Synthese mit den zugesetzten Säuren nicht verifiziert werden konnte[2]). Sonderhoff und Deffner haben sich auch mit dem Abbau der Citronensäure durch sterile Hefe beschäftigt; sie konnten jedoch nur einen geringfügigen Umsatz feststellen[3]).

Es hat sich herausgestellt, daß die Zellwand der lebenden Hefe ganz spezifische Permeabilitätsverhältnisse besitzt[4]). So kann z. B. die zellvertraute Brenztraubensäure nur beschränkt ins Innere der Hefe, an die wirksamen Enzyme gelangen und wird daher von lebender Hefe nur langsam abgebaut. Noch frappanter liegen die Verhältnisse bei der Hexosediphosphorsäure, die von lebender Hefe überhaupt nicht vergoren wird, weil die intakte Zellwand sie vollständig zurückhält.

Es lag daher nahe anzunehmen, daß der geringfügige Abbau von Bernsteinsäure bzw. Citronensäure durch verarmte Hefe seine Ursache in der geringen Durchlässigkeit der intakten Hefemembran hat, und es erschien lohnend, die Versuche über den Abbau dieser Säuren unter Verwendung von in flüssiger Luft eingefrorener und wieder aufgetauter Hefe, bei der die Zellwände geplatzt sind[4]), aufzunehmen.

Zu den Versuchen kam Bierhefe (von der Löwenbrauerei München) in Anwendung, die durch 20-stündiges Schütteln

[1]) Vgl. Anm. 1, S. 203.
[2]) H. Wieland u. R. Sonderhoff, A. **503**, 61 (1933).
[3]) R. Sonderhoff u. M. Deffner, A. **525**, 132 (1936).
[4]) F. Lynen, A. **539**, 1 (1939).

unter Sauerstoff an Inhaltsstoffen verarmt worden war. Die verarmte Hefe[1]) wurde in flüssige Luft eingetragen, einige Zeit bei der tiefen Temperatur belassen und nach dem Auftauen[2]) zu den Versuchen verwendet. Bei einem Teil der Versuche kam aufgetaute Hefe nach 3-maligem Auswaschen mit Wasser[3]) oder ein daraus dargestelltes Trockenpräparat[4]) zur Anwendung.

Zunächst wurde mit Hilfe der Methylenblau-Technik untersucht, ob bei der Bernsteinsäure-, Äpfelsäure- oder Citronensäuredehydrase der Hefe Co-Fermente notwendig sind. Wie Tab. 1 zeigt, können gefrorene Hefe und ebenso auch die ausgewaschenen Zelltrümmer allein, ohne weitere Zusätze, den Wasserstoff von der Bernsteinsäure auf den Farbstoff übertragen. Die Bernsteinsäuredehydrase der Hefe braucht also ebenso wie das entsprechende tierische Enzym kein Co-Ferment.

Tabelle 1.

Die Methylenblauversuche wurden in Thunberg-Röhren nach Bertho ausgeführt[5]).

Hefestamm Ps 13/7. Gas: reiner Stickstoff. $T = 30°$. Gesamtvolumen: 5 ccm. Jeder Ansatz enthielt 1 ccm Hefesuspension in Wasser (200 mg gefrorene Hefe bzw. Zelltrümmer), 1 ccm $^{m}/_{15}$-Phosphatpuffer $p_H = 6{,}6$ und 1 ccm $^{m}/_{400}$-Methylenblau.

	Entfärbungszeit				
	mit gefror. Hefe		mit Zelltrümmern		
Leerversuch	> 144′	> 144′	> 360′	> 360′	
$^{m}/_{80}$-Na-succinat . . .	92′	96′	95′	104′	92′

[1]) Die verarmte Hefe wurde jedesmal mikroskopisch auf Abwesenheit von Bakterien untersucht.

[2]) Bezeichnung: gefrorene Hefe.

[3]) Bezeichnung: Zelltrümmer. Methodik vgl. A. **539**, 5.

[4]) Bezeichnung: Trockenpräparat. Zu seiner Darstellung wurde die ausgewaschene Hefe in dünner Schicht auf Glasplatten ausgestrichen und bei Zimmertemperatur getrocknet. Das Trockenpräparat ist, im Eisschrank aufbewahrt, längere Zeit haltbar.

[5]) Methodik vgl. Bertho-Grassmann, Biochemisches Praktikum, S. 152. Leipzig 1936.

Anders liegen die Verhältnisse bei der Äpfelsäuredehydrase. Wie aus Tab. 2 ersichtlich ist, kann ein Trockenpräparat aus ausgewaschener Hefe nur dann Methylenblau mit Äpfelsäure entfärben, wenn gleichzeitig eine Co-ferment-haltige Lösung aus Hefe zugesetzt wird. Der wirksame Bestandteil der Co-Fermentlösung ist Codehydrase II, wie aus Tab. 3 hervorgeht[1]).

Tabelle 2.

Hefestamm Rp 15/5. Gas: reiner Stickstoff. $T = 34°$. Gesamtvolumen: 3,5 ccm. Jeder Ansatz enthielt 1 ccm Hefesuspension in $^m/_5$-Phosphat $p_H = 6{,}6$ (50 mg Trockenpräparat), 0,5 ccm $^m/_8$-Na-Malat (d,l-Form) und 0,5 ccm $^m/_{400}$-Methylenblau.

Co-Fermentlösung[2]) in ccm	—	0,033	0,067	0,17
Entfärbungszeit	> 120′	49′	37′	15′

Tabelle 3.

Oberhefe. $T = 32°$. 200 mg Zelltrümmer. Gesamtvolumen: 3,1 ccm. Im übrigen wie oben.

Lösung von Codehydrase II[3]) in ccm	0,1	—
Entfärbungszeit	14′	53′

Bei der Dehydrierung von *Citronensäure* durch gefrorene Hefe bzw. Trockenpräparat muß ebenfalls Kochsaft oder Co-Fermentlösung zugegeben werden (Tab. 4 und 5).

---

[1]) Das System, das den Wasserstoff von der Äpfelsäure auf das Methylenblau überträgt, besteht also aus: Äpfelsäure-apodehydrase, Codehydrase II und gelbem Ferment. Dihydro-codehydrase II kann ja ihren Wasserstoff nicht direkt auf den Farbstoff übertragen, sondern benötigt dazu einen Überträger, ein „gelbes Ferment". Äpfelsäure-apodehydrase und „gelbes Ferment" sind an die Struktur der Hefe gebunden.

[2]) Die Co-Fermentlösung war in Anlehnung an die Vorschrift von Warburg u. Christian [Bio. Z. **298**, 150 (1938)] aus Hefekochsaft über: Phenolextrakt — Vorfällung mit $AgNO_3$ — Fällung mit Hg-Acetat und Zerlegung mit H_2S dargestellt worden. Aus 3,5 kg Hefe wurden 100 ccm Co-Fermentlösung mit einem Trockengehalt von 7,7 g erhalten.

[3]) Die Lösung von Codehydrase II wurde aus vorstehendem Rohprodukt durch Fraktionierung der Ba-Salze nach Warburg u. Christian [Bio. Z. **287**, 291 (1936)] gewonnen. Das aus 20 ccm Co-Fermentlösung erhaltene Bariumsalz wurde nach der Zerlegung mit 2 n-Schwefelsäure mit Wasser auf 18 ccm verdünnt.

Tabelle 4.

Hefestamm Ps 13/7. Gas: reiner N_2. $T = 30°$. Gesamtvolumen: 6 ccm. Jeder Ansatz enthielt 1 ccm Hefesuspension in Wasser (200 mg gefrorene Hefe), 1 ccm $^m/_{15}$-Phosphat $p_H = 6{,}6$ und 1 ccm $^m/_{400}$-Methylenblau.

$^m/_{10}$-Na-Citrat in ccm	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—
Kochsaft[1]) in ccm	—	0,1	0,2	0,4	0,5	0,5
Entfärbungszeit	87′	55′	27′	19′	19′	47′

Tabelle 5.

Hefestamm Rp 15/5. 50 mg Trockenpräparat. Gesamtvolumen: 4 ccm. 1 ccm $^m/_5$-Phosphat $p_H = 6{,}6$. 0,5 ccm $^m/_{10}$-Na-Citrat. 0,5 ccm $^m/_{400}$-Methylenblau. Ansatz wie oben.

Co-Fermentlösung[2]) in ccm .	—	0,01	0,02	0,05	0,10
Entfärbungszeit	> 120′	54′	32′	19′	11′

Bevor die weiteren Methylenblauversuche mit Citronensäure besprochen werden, müssen wir zuerst noch auf den Mechanismus des Citronensäureabbaus durch Hefe näher eingehen.

Martius hat für tierische Gewebe folgenden Abbauweg bewiesen[3]). Zunächst stellt sich in einer Phase ohne Wasserstoffverschiebung ein Gleichgewicht zwischen Citronensäure, *cis*-Aconitsäure und Isocitronensäure ein. An der Isocitronensäure setzt dann erst die eigentliche Dehydrierung ein, die zu Oxalobernsteinsäure führt. Die Oxalobernsteinsäure ist jedoch nicht beständig, sondern spaltet spontan CO_2 ab und geht in α-Ketoglutarsäure über.

Wenn der Abbau in der Hefe nach demselben Schema verläuft, dann muß ein Unterschied in der Entfärbungszeit bestehen, je nachdem, ob die Citronensäure vor Zugabe des Methylenblaues schon einige Zeit mit der Hefe in Berührung war oder ob sie erst mit dem Farbstoff zusammen zugegeben wird. Im ersten Fall kann die Dehydrierung sofort einsetzen,

---

[1]) Bereitung des Kochsaftes: Gefrorene verarmte Hefe wird aufgetaut, $^1/_4$ Stunde bei 5000 Umdr./Min. zentrifugiert, die überstehende Lösung kurz aufgekocht, von Eiweißflocken durch Zentrifugieren befreit und dann zu den Versuchen verwendet.

[2]) Vgl. Anm. 2, S. 206.

[3]) C. Martius, H. **247**, 104 (1937); **257**, 29 (1939).

da die Hefe genügend Zeit gehabt hat, Isocitronensäure zu bilden, während im zweiten Fall aus der zugesetzten Citronensäure erst Isocitronensäure gebildet werden muß, bevor die Dehydrierung, d. h. die Entfärbung des Methylenblaus einsetzt. Die Entfärbungszeit muß also im ersten Fall kürzer sein als im zweiten. Tab. 6 enthält die Ergebnisse aus 2 Versuchen, die zeigen, daß tatsächlich in den Ansätzen, in denen die Citronensäure bereits vor Zugabe des Methylenblaus mit der Hefe in Berührung war (I), der Farbstoff schneller entfärbt wird als in den analogen Ansätzen, in denen das Substrat erst mit dem Farbstoff zusammen zugegeben wurde (II).

Tabelle 6.

Gas: reiner Stickstoff. Jeder Ansatz enthält 1 ccm Hefesuspension n $^{m}/_{5}$-Phosphat $p_H = 6{,}6$ [a) 50 mg Trockenpräparat; b) 200 mg Zelltrümmer], 0,5 ccm $^{m}/_{10}$-Na-Citrat und 0,1 ccm Co-Fermentlösung[1]).

a) Hefestamm Rp 15/5. $T = 26°$. Gesamtvolumen: 3,1 ccm. 0,5 ccm $^{m}/_{400}$-Methylenblau.			b) Oberhefe. $T = 30°$. Gesamtvolumen: 3,6 ccm. 1,0 ccm $^{m}/_{400}$-Methylenblau.	
Ansatz	I	II	I	II
Entfärbungszeit . . .	12′	18′	18′	24′

Bei I wurde das Citrat 20 Minuten vor dem Methylenblau zur Hefe zugegeben, bei II mit dem Methylenblau zusammen.

Ein weiterer Beweis dafür, daß der Abbau der Citronensäure durch Hefe nach dem Schema von Martius über Isocitronensäure und α-Ketoglutarsäure läuft, ist auch in der weiter unten (S. 212) noch zu besprechenden Tatsache gegeben, daß beim oxydativen Abbau der Citronensäure *Bernsteinsäure* als Zwischenprodukt auftritt.

Das die Citronensäure dehydrierende Enzymsystem der Hefe setzt sich also ebenso wie das tierische System aus 2 Fermenten zusammen, aus der Aconitase, welche das Gleichgewicht Citronensäure $\rightleftarrows$ Isocitronensäure katalysiert, und aus der Isocitronensäure-dehydrase. Diese selbst besteht aus Apoferment und Co-Ferment. Letzteres ist beim Hefeenzym,

[1]) Vgl. Anm. 2, S. 206.

ebenso wie beim tierischen Enzym[1]), Codehydrase II[2]) (Tab. 7).

Tabelle 7[3]).

Hefestamm Rp 15/5. Gas: reiner N_2. $T = 30°$. Gesamtvolumen: 3,4 ccm. Jeder Ansatz enthielt 1 ccm Hefesuspension in $^m/_5$-Phosphat $p_H = 6{,}6$ (50 mg Trockenpräparat) und 0,5 ccm $^m/_{400}$-Methylenblau.

$^m/_{10}$-Na-Citrat[4]) in ccm	0,5	0,5	0,5	0,5	—
Lösung von Codehydrase II[5]) in ccm .	0,4	0,2	0,1	0,05	0,2
Entfärbungszeit	12′	11′	12′	18′	> 45′

Das Dehydrierungsprodukt der Isocitronensäure, die Oxalobernsteinsäure hemmt die Dehydrase nicht, was darin zum Ausdruck kommt, daß Semicarbazid als Abfangmittel für Ketoverbindungen keinen Einfluß auf die Entfärbungsgeschwindigkeit ausübt (Tab. 8).

Tabelle 8.

Hefestamm Ps 13/7. Gas: reiner N_2. $T = 30°$. Gesamtvolumen: 6,0 ccm. Jeder Ansatz enthielt 1 ccm Hefesuspension in Wasser (200 mg gefrorene Hefe), 1 ccm $^m/_{15}$-Phosphat $p_H = 6{,}6$, 0,25 ccm Kochsaft und 1 ccm $^m/_{400}$-Methylenblau.

$^m/_{10}$-Na-Citrat	0,5	0,5	—	—
$^m/_{10}$-Semicarbazid	—	0,3	—	0,3
Entfärbungszeit	25′	25′	59′	59′

Allerdings kann dies auch davon herrühren, daß die Oxalobernsteinsäure sich gar nicht ansammelt, sondern sofort nach ihrer Entstehung zu α-Ketoglutarsäure decarboxyliert wird.

Nach Klärung der Co-Fermentfrage wurden Versuche ausgeführt, in denen die relative Aktivität der einzelnen Dehydrasen gegenüber Methylenblau bestimmt wurde (Tab. 9 und 10).

---

[1]) E. Adler, H. v. Euler, G. Günther u. M. Plass, Bioch. J. **33**, 1028 (1939).

[2]) Das System, das den Wasserstoff von der Isocitronensäure auf das Methylenblau überträgt, besteht also aus: Isocitronensäure-apodehydrase, Codehydrase II und gelbem Ferment. Dihydro-codehydrase II kann ja ihren Wasserstoff nicht direkt auf den Farbstoff übertragen, sondern benötigt dazu einen Überträger, ein „gelbes Ferment". Isocitronensäure-apodehydrase und „gelbes Ferment" sind an die Struktur der Hefe gebunden.

[3]) Vgl. Tab. 5.

[4]) Das Citrat wurde in allen Methylenblauversuchen, außer in denen von Tab. 6, 20 Minuten vor dem Methylenblau zur Hefe zugesetzt, damit die Hefe genügend Zeit hatte, Isocitronensäure zu bilden.

[5]) Vgl. Anm. 3, S. 206.

Tabelle 9.

Hefestamm Rs 12/4. Gas: reiner N_2. $T = 30°$. Gesamtvolumen: 5 ccm. Jeder Ansatz enthielt 1 ccm Hefesuspension in Wasser (200 mg gefrorene Hefe), 1 ccm $^m/_{15}$-Phosphat $p_H = 6{,}6$ und 1 ccm $^m/_{400}$-Methylenblau.

Ansatz	I	II	III
$^m/_{10}$-Na-Succinat	0,5	—	—
$^m/_{10}$-Na-Citrat	—	0,5	—
Kochsaft[1])	0,5	0,5	0,5
Entfärbungszeit	30′	18′	47′

Tabelle 10.

Hefestamm Ra 9/6. Gas: reiner N_2. $T = 30°$. Gesamtvolumen: 5,5 ccm. Jeder Ansatz enthielt 1 ccm Hefesuspension in Wasser (200 mg gefrorene Hefe), 1 ccm $^m/_{15}$-Phosphat $p_H = 6{,}6$, 0,5 ccm Kochsaft[1]) und 1 ccm $^m/_{400}$-Methylenblau.

$^m/_8$-Na-Malat (d,l-Form)	0,5	—
Entfärbungszeit	36′	63′

Die Ergebnisse von Tab. 9 und 10 sind zwar nicht exakt miteinander vergleichbar, — es handelt sich um verschiedene Hefestämme und auch die Versuchsbedingungen sind nicht ganz gleich — soviel kann aber doch ausgesagt werden, daß die Apfelsäure langsamer dehydriert wird als die Citronensäure (vgl. auch die Methylenblauversuche aus Tab. 2 und 5 miteinander), aber ungefähr ebenso schnell wie die Bernsteinsäure. Viel bemerkenswerter aber ist die Tatsache (Tab. 9), daß Citronensäure bzw. die daraus entstehende Isocitronensäure durch Methylenblau viel rascher dehydriert wird als Bernsteinsäure (Ansatz I und II)[2]).

[1]) Vgl. Anm. 1, S. 207.

[2]) Unter der Annahme, daß die Dehydrierung in jedem Ansatz vom Zugeben des Farbstoffs bis zu dessen Entfärbung mit konstanter Geschwindigkeit verläuft, kann man die Aktivitäten der Isocitronensäure- und Bernsteinsäuredehydrase folgendermaßen berechnen:

Ansatz III: Hefe + Kochsaft brauchen zur Entfärbung des zugesetzten 1 mg Methylenblau 47′, entfärben also in 1′: 1/47 mg MB.

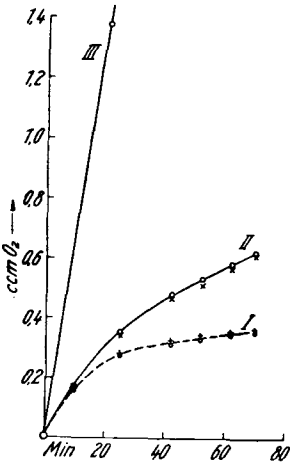
Ansatz II: Hefe + Kochsaft mit Citrat entfärben in 1′: 1/18 mg MB., davon entfärben Hefe + Kochsaft allein 1/47 mg, so daß auf die Wirkung der Isocitronensäuredehydrase 1/18—1/47 = 1/29 mg MB. entfällt.

Ansatz I: Wird dieselbe Rechnung auch für diesen Ansatz durchgeführt, so ergibt sich, daß die Bernsteinsäuredehydrase in 1′: 1/83 mg MB. entfärbt.

Für die Wirkung der Äpfelsäuredehydrase aus Tab. 10 berechnet sich auf dieselbe Weise: 1/84 mg MB. pro 1′.

Wenn dieser Unterschied in den Dehydrierungsgeschwindigkeiten auch gegenüber Sauerstoff als Wasserstoffacceptor besteht, dann sollte es möglich sein, beim oxydativen Abbau der Citronensäure mit gefrorener Hefe Bernsteinsäure zu isolieren.

Wie in einer folgenden Arbeit ausgeführt und bewiesen wird zeichnet sich das Enzymsystem der Zelle, welches die Dehydrierung der Bernsteinsäure zu Fumarsäure mit Sauerstoff als Wasserstoffacceptor katalysiert — da es sich



Hefestamm Ps. $T = 30°$. Gas: Luft. Gesamtvolumen: 2 ccm. 1 ccm Hefesuspension in $^{m}/_{7,5}$-Phosphat $p_H = 7{,}4$, die 500 mg gefrorene Hefe (I, II) bzw. Frischhefe (III) enthält. II: $^{m}/_{33}$-Na-succinat. III: $^{m}/_{2}$-Alkohol.

Atmung von gefrorener Hefe mit Bernsteinsäure.

ausschließlich aus strukturgebundenen Enzymen aufbaut und kein lösliches Co-Ferment mit einschließt — dadurch aus, daß es durch die Vorbehandlung mit flüssiger Luft in keiner Weise geschädigt wird. Die Sauerstoffaufnahme der gefrorenen Hefe mit Bernsteinsäure ist also ein direktes Maß für die Fähigkeit der Hefezelle, die erste Stufe des oxydativen Abbaus der Bernsteinsäure, die Dehydrierung zu Fumarsäure, durchzuführen. Ein derartiger Atmungsversuch ist in der Figur wiedergegeben.

Der Unterschied in der Sauerstoffaufnahme durch gefrorene Hefe mit (II) und ohne (I) Bernsteinsäure beträgt zwischen 42 und 70 Minuten nach Versuchsbeginn 100 cmm. Da 11,2 ccm O_2 zur Dehydrierung von

1 Mmol Bernsteinsäure (zu Fumarsäure) benötigt werden, entspricht dies einem Verbrauch von 0,089 Mmol Bernsteinsäure (500 mg feuchte Hefe = etwa 100 mg Trockengewicht; 28 Minuten) oder 0,191 Mmol Bernsteinsäure (1 g Hefe trocken in 1 Stunde).

Die Bernsteinsäuredehydrase der Hefe ist also tatsächlich wenig aktiv. Der von ihr verbrauchte Sauerstoff macht, wie der Vergleich von Kurve II und III aus der Figur zeigt, nur einen geringen Bruchteil der Atmung von verarmter Frischhefe mit Alkohol aus, und es ist daher verständlich, daß beim Abbau von Alkohol[1]) oder Essigsäure[2]) durch Hefe, Bernsteinsäure als Zwischenprodukt faßbar ist.

Beim Abbau der Citronensäure ist, wie die Methylenblauversuche gezeigt haben, ein Co-Ferment beteiligt. Will man daher den Umsatz der Citronensäure durch gefrorene Hefe studieren, so muß man, damit die löslichen Bestandteile des Enzymsystems nicht verdünnt werden, die gefrorene Hefe, ebenso wie bei den Versuchen mit Alkohol[3]), in Kochsaft anstatt in Wasser suspendieren. Unter diesen Bedingungen wird die Citronensäure rasch abgebaut. Als Reaktionsprodukt kann dabei *Bernsteinsäure* isoliert werden, wie die folgenden Versuche zeigen.

Versuch 1. 30 g gefrorene Hefe (Stamm Rs) wurden in einer Rollflasche mit 15 ccm Kochsaft und 1,5 g Na-Citrat versetzt, der Gasraum mit reinem Sauerstoff gefüllt und 1 Stunde lang im Thermostaten bei 30° geschüttelt. Am Ende des Versuchs wurden Schwefelsäure und eine 20-proc. Na-Wolframatlösung zugegeben, das Ganze mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt und der ausgefallene Niederschlag abzentrifugiert. In 10 ccm der überstehenden Lösung wurde die Citronensäure nach Kometiani[4]) zurückbestimmt (18,9 mg). Also insgesamt 189 mg Citronensäure zurückgefunden.

Zur Bernsteinsäurebestimmung wurden 30 ccm der Lösung 14 Stunden lang mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt enthielt 64 mg Trockensubstanz. Er wurde in schwefelsaurer Lösung mit $KMnO_4$-Lösung auf dem Wasserbad oxydiert, der ausgeschiedene Braunstein mit schwefliger Säure reduziert und die Lösung abermals 14 Stunden lang mit Äther extrahiert. Dabei wurden 12 mg reine Bernsteinsäure isoliert, was auf den ganzen Ansatz umgerechnet 40 mg Bernsteinsäure entspricht.

---

[1]) H. Wieland u. F. Wille, A. **503**, 70 (1933).
[2]) Vgl. Anm. 1, S. 203. [3]) F. Lynen, A. **539**, 1 (1939).
[4]) P. A. Kometiani, Fr. **86**, 359 (1931).

Ein Parallelversuch ohne Citronensäure enthielt nur 10 mg Bernsteinsäure.

Versuch 2. Ein gleichartig durchgeführter Versuch mit 22 g gefrorener Hefe, 10 ccm Kochsaft und 1,5 g Na-Citrat, der nicht mit Wolframat, sondern durch Aufkochen in essigsaurer Lösung von Eiweiß befreit worden war, lieferte 25 mg Bernsteinsäure. Obwohl insgesamt 450 mg Citronensäure abgebaut waren, konnte aus der enteiweißten Lösung mit 1,4-Dinitrophenylhydrazin das entsprechende Hydrazon der α-Ketoglutarsäure nicht isoliert werden.

Das primäre Dehydrierungsprodukt der Isocitronensäure, die α-Ketoglutarsäure konnte sich in den obigen Ansätzen nicht anhäufen, sondern wurde von der Hefe sofort weiter zu Bernsteinsäure dehydriert.

Der größte Teil der auf diese Weise entstehenden Bernsteinsäure wird von der Hefe über Fumarsäure, Äpfelsäure usw. (vgl. Schema S. 203) weiter abgebaut, ein anderer Teil aber bleibt liegen, da — wie oben gezeigt worden ist — die Bernsteinsäuredehydrase der Hefe weniger aktiv ist als die Isocitronensäuredehydrase, die Bernsteinsäure also nicht in dem Maße abgebaut wird, wie sie geliefert wird. Von den Abbaustufen der Citronensäure durch Hefe ist nur noch der Übergang der α-Ketoglutarsäure in Bernsteinsäure zu beweisen, was in den Versuchen 3 und 4 (Tab. 11) geschieht.

Die Methodik mußte bei den Ansätzen mit α-Ketoglutarsäure abgeändert werden, da 1. die unveränderte α-Ketoglutarsäure zurückbestimmt werden sollte und 2. die Bernsteinsäurebestimmung durch Ätherextraktion nach Permanganatoxydation nur bei Abwesenheit von α-Ketoglutarsäure anwendbar ist. α-Ketoglutarsäure geht nämlich ebenfalls in den ersten Ätherextrakt und liefert bei der Oxydation Bernsteinsäure. Die Bernsteinsäure wurde darum in Versuch 3 und 4 mit Hilfe eines Succinodehydrase-Präparates bestimmt.

Die Aufarbeitung der Ansätze geschah folgendermaßen:

1. Ansätze mit α-Ketoglutarsäure. Der Ansatz wurde am Ende des Versuchs mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. 40 ccm der Suspension wurden mit 5 ccm Eisessig versetzt, aufgekocht und nach dem Erkalten mit Wasser auf 50 ccm verdünnt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert und zu je 10 ccm des Filtrates eine Lösung von 1,4-Dinitrophenylhydrazin in verdünnter Salzsäure gegeben. Nach 12-stündigem Stehen im Eisschrank wurde das ausgefallene Hydrazon abfiltriert, mit

verdünnter Lauge vom Filter gelöst und das klare Filtrat mit 2 n-Salzsäure angesäuert. Nach 12-stündigem Stehen im Eisschrank wurde das umgefällte Hydrazon abfiltriert, gewaschen und nach dem Trocknen im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure und Ätzkali gewogen. Diese Bestimmungsmethode der α-Ketoglutarsäure liefert um etwa 10 Proc. zu niedere Werte.

Tabelle 11.

Versuch	Hefestamm	Gefr. Hefe	Kochsaft	Citronensäure[1] in Mmol		α-Ketoglutarsäure[2] in Mmol		Bernsteinsäure in Mmol gef.
				einges.	umges.	einges.	umges.	
1a	Rs	30 g	15 ccm	4,20	3,22	—	—	0,34
b				—	—	—	—	0,085
2	Rs	22 g	10 ccm	4,20	2,34	—	—	0,21
3a				4,20	2,51	—	—	0,79
b	Rp 15/5	30 g	15 ccm	—	—	4,20	2,49	1,68
c				—	—	—	—	0,21
4a				4,20	3,38	—	—	0,57
b	Rs 23/6	30 g	10 ccm	—	—	4,20	2,26	0,86
c				—	—	—	—	0,22

Die Dauer der Versuche war überall 1 Stunde. $T = 30°$. Gas: Sauerstoff.

Der Rest der Hefesuspension (60 ccm) wurde mit Schwefelsäure und Na-wolframat versetzt, mit Wasser auf 100 ccm verdünnt und der Niederschlag abzentrifugiert. 30 ccm der überstehenden Lösung wurden 14 Stunden lang mit Äther extrahiert, der Äther abgedampft und der Rückstand getrocknet. Der Rückstand wurde mit $^n/_{10}$-Natronlauge titriert und in einem aliquoten Teil der neutralisierten Lösung die Bernsteinsäure bestimmt.

2. Ansätze mit Citronensäure oder ohne Substrat: Wie in Versuch I (vgl. S. 212) aufgearbeitet. Zur Bernsteinsäurebestimmung wurde der Inhalt des ersten Ätherextraktes mit $^n/_{10}$-Natronlauge neutralisiert und ein aliquoter Teil der Lösung dem Fermentpräparat zugesetzt.

Das Fermentpräparat wurde zu den Bernsteinsäurebestimmungen aus Taubenbrustmuskel frisch dargestellt. Der einem frisch geschlachteten Tier entnommene Brustmuskel wurde in der Latapiemühle gemahlen und portionsweise in flüssige Luft eingetragen. Nach 1 Stunde oder später wurde der Gewebebrei aufgetaut, mit der 5—10-fachen Menge eisgekühlten, destillierten Wassers gründlich durchgerührt und zentrifugiert. Nach 5-maligem Waschen wurde der Bodenkörper in der 10-fachen Menge $^m/_{7,5}$-Phosphat $p_H = 7{,}4$ suspendiert und zu den Versuchen verwendet. Das so dargestellte Präparat zeigt keine Selbstatmung mehr.

[1]) Als Na-Salz. [2]) Als freie Säure.

Die Bestimmung der Bernsteinsäure wurde in Barcoft-Warburg-Gefäßen vorgenommen. $T = 38°$, Gas: Luft. Gesamtvolumen: 3,5 ccm. Im Hauptraum der Gefäße befand sich 2 ccm der gewaschenen Muskelsuspension, im Seitengefäß 1,5 ccm der Lösung, deren Bernsteinsäuregehalt (zwischen 1 und 10 mg) bestimmt werden sollte. Im Einsatz war ein mit 2n-NaOH getränktes Röllchen Filtrierpapier. Nach Schließen der Hähne wurde der Inhalt des Seitengefäßes zugekippt und die Sauerstoffaufnahme bestimmt. 11,2 ccm O_2 entsprechen 0,118 mg Bernsteinsäure. Jede Bestimmung wurde 2-mal ausgeführt. Jede Versuchsserie enthielt einen Kontrollansatz mit bekanntem Bernsteinsäuregehalt. Fehler der Bestimmung: < 10 Proc.

Überraschend an den Versuchen mit Citronensäure ist die Tatsache, daß sie von der gefrorenen Hefe so rasch abgebaut wird[1]). Die Umsatzgröße, d. h. der Verbrauch des Substrates in Mmol pro 1 g Hefe (trocken) und Stunde beträgt bei den untersuchten Hefestämmen 0,420—0,563, liegt also in derselben Größenordnung wie die Umsatzgrößen für Essigsäure, für welche 0,308—0,825[2]) bzw. 1,10—1,90[2,3,4]) (bei verschiedenen Hefestämmen) gefunden wurden. Berücksichtigt man weiterhin, daß beim oxydativen Abbau der Essigsäure unter geeigneten Versuchsbedingungen Citronensäure faßbar ist, so ist es wahrscheinlich, daß die Hefe Acetat nicht nur im Sinne des Schemas von Wieland und Sonderhoff über Bernsteinsäure, Fumarsäure usw. (vgl. S. 203), sondern daneben zu einem großen Teil auch über Citronensäure abbaut. Bei letzterem Abbau muß die Essigsäure zuerst mit Oxalessigsäure — die entweder aus zelleigenen Substanzen oder aus der nach Wieland und Sonderhoff gebildeten Bernsteinsäure stammt — die Kondensation zu Citronensäure eingehen, die dann über Isocitronensäure, α-Ketoglutarsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure und Äpfelsäure in Oxalessigsäure übergeführt wird, die dann von neuem mit Essigsäure zusammen Citronensäure bildet usw.

---

[1]) Sonderhoff u. Deffner haben in ihren Versuchen mit frischer, steriler Hefe nur 0,003—0,004 Mmol Citronensäure pro Gramm Hefe und Stunde abbauen können (vgl. Anm. 3, S. 204). Der Grund dafür liegt in der Undurchlässigkeit der Hefemembran.

[2]) Vgl. Anm. 1, S. 203.

[3]) R. Sonderhoff u. M. Deffner, A. **536**, 36 (1938).

[4]) R. Sonderhoff u. H. Thomas, A. **530**, 195 (1937).

Für die Fähigkeit der Hefezelle, aus Oxalessigsäure und Essigsäure Citronensäure zu synthetisieren, sind die Versuche von Sonderhoff und Thomas[1]) mit Deutero-Essigsäure (D_3-Essigsäure) beweisend. Die Autoren konnten beim oxydativen Abbau von „schwerem" Ba-Acetat eine Citronensäure isolieren, deren Deuteriumgehalt genau mit dem Wert übereinstimmt, der bei der Kondensation von Oxalessigsäure mit D_3-Essigsäure erwartet werden muß[2]).

Zwei frühere Beobachtungen, die wir kurz diskutieren möchten, sprechen ebenfalls dafür, daß der Abbau der Essigsäure zum Teil über Citronensäure geht:

[1]) Vgl. Anm. 4, S. 215.

[2]) Wir haben versucht, die anaerobe Synthese der Citronensäure aus Oxalessigsäure und Essigsäure mit gefrorener Hefe durchzuführen und konnten dabei nach Kometiani (a. a. O. S. 212) Citronensäure als Pentabromaceton nachweisen. Einen derartigen Versuch zeigt die folgende Tabelle:

Ansatz	I	II	III	IV
Na-Acetat	1 g	1 g	—	1 g
Oxalessigsäure (als Na-Salz)	500 mg	—	500 mg	500 mg
Citronensäure gefunden . .	38 mg	0 mg	25,5 mg	19,5 mg

Ansatz I—III: 15 g gefrorene Hefe; Ansatz IV: 15 g gefrorene Hefe nach kurzem Aufkochen. Gas: reiner Stickstoff. Außerdem enthielt jeder Ansatz noch 25 ccm Wasser, in dem die Zusätze aus der Tabelle gelöst waren. Das Ganze wurde 2 Stunden lang bei 30° geschüttelt.

Aus der Oxalessigsäure entsteht ohne die Mitwirkung eines Fermentes [wahrscheinlich beim Neutralisieren mit Lauge, vgl. F. L. Breusch, H. **250**, 262 (1937)] eine von Citronensäure verschiedene Substanz, die bei der Bestimmungsmethode ebenfalls Pentabromaceton liefert. Die Menge dieser Substanz gibt Ansatz IV an, bei dem die Enzyme durch Erhitzen zerstört wurden. Man muß daher, um die tatsächlich gebildete Citronensäure in den verschiedenen Ansätzen zu erfahren, von den Citronensäure-Werten der Tab. 19,5 mg abziehen.

Des weiteren ist es uns gelungen, aus einem Ansatz, der wie Ansatz I zusammengesetzt war, 42 mg umkrystallisiertes Chininsalz vom Schmelzp. 190° zu isolieren, dessen Mischschmelzpunkt mit Chinincitrat ebenfalls bei 190° lag. Da die Isolierung des Chininsalzes, die mehrmals gelang, in einigen Fällen fehlschlug, möchten wir diese Ergebnisse vorerst noch mit einem gewissen Vorbehalt wiedergeben. Wir sind mit der Erforschung dieser Diskrepanz zur Zeit noch beschäftigt.

1. Citronensäure tritt nur bei Gegenwart von $Ba^{\cdot\cdot}$ auf. Gleichzeitig hemmt aber das $Ba^{\cdot\cdot}$, verglichen mit Ansätzen ohne $Ba^{\cdot\cdot}$, den Essigsäureabbau[1]). Es ist bekannt, daß $Ba^{\cdot\cdot}$ die Dehydrierung von Citronensäure hemmt[2]). Bei Gegenwart von $Ba^{\cdot\cdot}$ geht also der Abbau von Citronensäure nur langsam vor sich, die zur Kondensation mit Essigsäure notwendige Oxalessigsäure (vgl. S. 215) wird daher nur langsam aus der Citronensäure zurückgebildet, was eine Verringerung des Essigsäureumsatzes und eine Anhäufung von Citronensäure im Gefolge hat.

2. Sonderhoff und Thomas haben bei ihren Versuchen mit D_3-Acetat eine Bernsteinsäure isoliert, bei der nur 50 Proc. der direkt an Kohlenstoff gebundenen Wasserstoffatome aus Deuterium bestanden[3]), obwohl man bei einer Bernsteinsäure, die durch Dehydrierung aus 2 Molekeln D_3-Acetat entstanden ist, 100 Proc. erwartet hätte. Ein Teil der Bernsteinsäure war eben nicht direkt aus der Essigsäure, sondern über Citronensäure aus ihr entstanden. Bei dieser Bernsteinsäure können aber, unter der wahrscheinlichen Annahme, daß die Wasserabspaltung gemäß nachstehender Formulierung an der Aconitase nach beiden Seiten, d. h. nach der $>CH_2$- und nach der $>CD_2$-Gruppe mit gleicher oder nur wenig verschiedener Geschwindigkeit verläuft, nur 25 Proc. der direkt an Kohlenstoff gebundenen Wasserstoffatome „schwer" sein.

Würde also der Abbau der Essigsäure zu $^1/_3$ nach dem alten Schema von Wieland und Sonderhoff, zu $^2/_3$ nach dem neuen Schema über Citronensäure gehen, so wäre der experimentell gefundene Deuteriumgehalt erklärt.

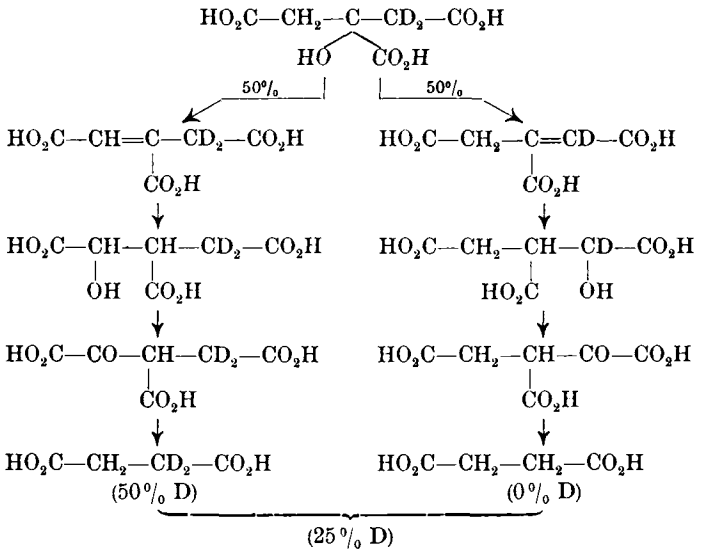
Zur Klärung der Verhältnisse haben wir den Abbau der Essigsäure durch gefrorene Hefe in Angriff genommen.

---

[1]) Vgl. R. Sonderhoff u. M. Deffner, S. 215.

[2]) Vgl. H. v. Euler u. W. Franke, Chemie der Enzyme, S. 572.

[3]) Vgl. R. Sonderhoff u. H. Thomas, S. 215.



Feodor Lynen ist der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung eines Stipendiums zu großem Dank verpflichtet.

Jodosoverbindungen als Oxydationsmittel;

von *Rudolf Criegee* und *Hans Beucker*.

Mit 1 Figur im Text.

[Aus den chemischen Instituten der Universität Marburg und der Technischen Hochschule Karlsruhe.]

(Eingelaufen am 26. August 1939.)

Bei Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Molekülbau und Oxydationsverlauf[1]) hat der eine von uns meist mit *einem* Oxydationsmittel, nämlich mit dem von Dimroth[2]) in die organische Praxis eingeführten *Blei-*

[1]) Vgl. z. B. Criegee, A. **481**, 263 (1930); Criegee, Kraft u. Rank, A. **507**, 159 (1933).

[2]) B. **53**, 484, 487 (1920); **54**, 3058 (1921); **55**, 1231 (1922); **56**, 1375 (1923).

tetracetat, gearbeitet, um festzustellen, wie die Art der Reaktionsprodukte oder die Oxydationsgeschwindigkeit vom Bau des *Substrats* abhängt. Der Zweck der vorliegenden Arbeit war es dagegen, bei gleichbleibendem Substrat das *Oxydationsmittel* systematisch zu verändern und den dadurch geänderten Reaktionsverlauf zu untersuchen. Man könnte daran denken, zu diesem Zweck Oxydationen mit Mangani-, Kobalti- oder Thalli-acetat auszuführen. Aber schon das dem Bleitetracetat am meisten verwandte *Manganiacetat*, $Mn(OCOCH_3)_3$, verursacht unerwünschte Komplikationen. Es steht nämlich in Eisessiglösung im Gleichgewicht mit den Acetaten des 2- und 4-wertigen Mangans. Die oxydierende Wirkung auf organische Verbindungen beruht aber hauptsächlich auf dem Vorhandensein des letzteren, und dessen Konzentration nimmt im Laufe der Reaktion infolge Gleichgewichtsverschiebung durch das entstehende Mangan-(II)-salz so stark ab, das die Reaktionen nach kurzer Zeit fast zum Stillstand kommen.

Wir wandten uns daher den *organischen* Oxydationsmitteln zu, bei denen ja eine viel größere Variationsmöglichkeit besteht. In den *Salzen* der *Jodosoverbindungen* fanden wir nun in der Tat Stoffe, die dem Bleitetracetat in vieler Hinsicht ähneln und daher für unsern Zweck brauchbar waren. Auf die Ähnlichkeit zwischen Salzen des 4-wertigen Bleis und der Jodosoverbindungen wiesen übrigens schon vor einiger Zeit Dimroth und Bockemüller[1]) hin, die deren Fluoride zu milden Fluorierungen benutzten. Abgesehen von älteren Arbeiten von Willgerodt, dem Entdecker der Jodoso- und Jodoverbindungen, und anderen[2]) über deren oxydierende Eigenschaften liegt noch ein Vortragsreferat von S. Skraup[3]) über Oxydationen mit Jodoso-benzoaten vor. Schließlich erschien ganz kürzlich eine Arbeit von R. Neu[4]) über Oxydationen mit Jodidchloriden.

---

[1]) B. **64**, 516, 522 (1931); vgl. auch Garvey, Halley u. Allen, Am. **59**, 1827 (1937).

[2]) Willgerodt, J. pr. **33**, 156 (1886); **59**, 198 (1899); R. Otto, B. **26**, 305 (1893); Tscherniac, B. **36**, 218 (1903).

[3]) Z. Ang. **49**, 25 (1936). [4]) B. **72**, 1505 (1939).

Wir selbst haben uns hauptsächlich mit den dem Bleitetracetat am ähnlichsten gebauten Jodoso-*acetaten* beschäftigt und fanden, daß diese alle vier für jenes Oxydationsmittel charakteristischen Reaktionen geben. Das sind 1. eigentliche Dehydrierungen, 2. oxydative Spaltung von Glycolen und verwandten Verbindungen, 3. Anlagerung von zwei acetylierten OH-Gruppen an Doppelbindungen und 4. Substitution von beweglichen H-Atomen durch eine acetylierte OH-Gruppe. Im folgenden soll nur von den Reaktionen 2 und 3 die Rede sein.

Die oxydierende Wirkung der Jodosoverbindungen wird unter anderem mit ihrem *Oxydationspotential* zusammenhängen. Es wäre also sehr erwünscht, diese Potentiale und ihre Abhängigkeit von der Konstitution zu kennen. Die Messungen, etwa durch Gleichgewichtseinteilung mit andern Redoxsystemen oder auch durch Potentialmessungen, scheitern aber an der großen Reaktionsträgheit. Qualitativ kann man sich von dem starken Oxydationsvermögen der Jodosoacetate überzeugen; denn man kann mit ihrer Hilfe sowohl Mangano- und Cobaltoacetat zu Mangani-Cobaltisalzen wie auch Chinizarin zu dem stark oxydierenden Chinizarinchinon oxydieren. Die Oxydation von Blei (II)- zu Blei (IV)-acetat gelingt dagegen nicht, doch läßt sich auch umgekehrt Jodbenzol nicht mit Bleitetracetat zu Phenyl-jodoso-acetat oxydieren.

Nun kann man aber die verschiedenen Jodoso-acetate als eine „dynamisch-homologe Reihe" ansehen und Dimroth[1]) hat gezeigt, daß in solchen Reihen häufig ein Zusammenhang zwischen Potential und Reaktionsgeschwindigkeit besteht. Wir haben daher die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen verschiedenen Jodosoacetaten einerseits und *Anethol* ($CH_3O.C_6H_4.CH:CH.CH_3$) andererseits gemessen. Wir wählten gerade diese ungesättigte Verbindung, weil sich gezeigt hatte, daß bei ihr eine glatte Anlagerung zweier Acetoxylgruppen an die Doppelbindung stattfindet, und weil die Oxydationsgeschwindigkeit in einem bequem meßbaren Bereich liegt.

[1]) Z. Ang. **46**, 571 (1933).

Außer dem Phenyl-jodoso-acetat, $C_6H_5J(OCOCH_3)_2$, selbst wurden einige seiner Derivate, die an Stelle von Kernwasserstoffatomen Methyl-, Nitro- und Phenylsulfon-gruppen in verschiedenen Stellungen enthielten, sowie das aliphatische Chlor-äthylen-jodoso-acetat, $CHCl:CHJ(OCOCH_3)_2$, in die Untersuchung einbezogen. Die Messungen erfolgten in Eisessig bei 20°. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zusatz von Kaliumjodid, mit dem die Jodosoacetate momentan unter Jodabscheidung reagieren.

Die Ergebnisse (vgl. die Figur) sind kurz folgende:

1. Die Geschwindigkeit wird durch die Art des verwendeten Jodosoacetats stark beeinflußt.

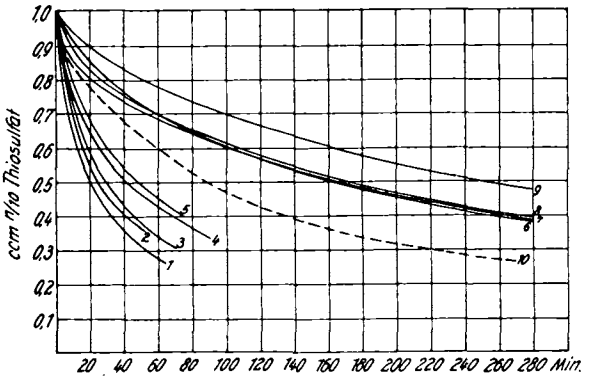
2. Die positivierenden Methylgruppen erhöhen, die negativierenden Nitro- und Sulfogruppen erniedrigen die Geschwindigkeit gegenüber der unsubstituierten Verbindung. Das Chlor-äthylen-jodoso-acetat schließt sich in seinem Verhalten dem Nitrophenyl-körper an. Geht also bei der Reaktion tatsächlich Potential und Geschwindigkeit Hand in Hand, dann würde das bedeuten, daß in der Reihe der untersuchten Verbindungen das p-Tolyl-jodoso-acetat das höchste, das p-Nitro-phenyl-jodoso-acetat das niedrigste Oxydationspotential besitzt.

3. Ein Substituent in der p-Stellung wirkt stärker beschleunigend oder verzögernd als ein solcher in m-Stellung; am kleinsten ist der Einfluß einer o-Methylgruppe; hier wirken vielleicht chemischer und sterischer Einfluß des Substitutienten gegeneinander.

4. Die Geschwindigkeit der Reaktion des Anethols mit *Bleitetracetat* ist ebenfalls in der Kurve aufgenommen; sie liegt in der gleichen Größenordnung. Ein Vergleich bezüglich des Potentials ist aber hier nicht mehr erlaubt, weil man das Bleitetracetat nicht mehr zur selben dynamisch-homologen Reihe rechnen kann.

5. Die für bimolekulare Reaktionen berechneten Konstanten nehmen in allen Fällen, und zwar annähernd gleichmäßig, ab. Vielleicht liegt das daran, daß das verwendete Anethol sterisch nicht ganz einheitlich war.

Nachdem durch diese Vorarbeiten eine Reihe der Jodosobenzole, geordnet nach steigender Reaktionsgeschwindigkeit und damit u. Umst. nach steigendem Potential, geschaffen war, wurde nunmehr die *präparative Oxydation* des *Cyclopentadiens* mit den gleichen Oxydationsmitteln untersucht. Derselbe Kohlenwasserstoff war schon früher[1]) mit Bleitetracetat oxydiert worden und hatte dabei merkwürdige Ergebnisse geliefert. Neben den normalen Additionsprodukten I



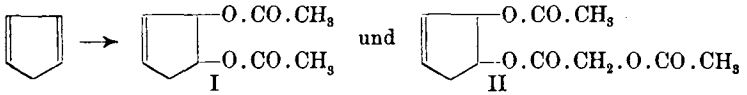
Jodosoacetate und *Anethol.*

Je 5 ccm $^{m}/_{10}$-Lösung zusammengegeben. $t = 20°$. Verbrauch an ccm $^{n}/_{10}$-Thiosulfat pro 1 ccm Reaktionslösung. Zeit in Minuten.

1. p-Tolyl-jodoso-acetat,
2. 2,4-Xylyl-jodoso-acetat,
3. m-Tolyl-jodoso-acetat,
4. o-Tolyl-jodoso-acetat,
5. Phenyl-jodoso-acetat,
6. Chloräthylen-jodoso-acetat,
7. m-Nitro-phenyl-jodoso-acetat,
8. p-Phenylsulfo-phenyl-jodoso-acetat,
9. p-Nitro-phenyl-jodoso-acetat,
10. Bleitetracetat.

fanden sich als Hauptprodukte Stoffe einer weitergehenden Oxydation, denen die Konstitution II von Essigsäure-glycolsäure-estern von Cyclopentendiolen gegeben werden konnte. Die Entstehung dieser Stoffe war durchaus rätselhaft geblieben und wurde damals mit der Oxydationsgeschwindigkeit in Zusammenhang gebracht. Es fragte sich also, ob auch Jodosoacetate derartige komplizierte Reaktionsprodukte liefern würden.

[1]) A. **481**, 263 (1930).

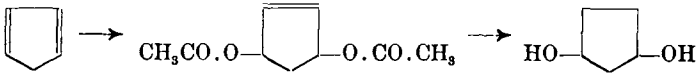


I II

Darüber hinaus war der sterische Verlauf der Addition an die Doppelbindung des Cyclopentadiens von Interesse. Es erschien möglich, daß ein Zusammenhang zwischen Oxydationsgeschwindigkeit oder -potential und dem Verhältnis von *cis*- zu *trans*-Addition vorhanden war.

Zur Untersuchung dieser Fragen wurde Cyclopentadien mit je einem Jodosoacetat von großer, mittlerer und kleiner Oxydationsgeschwindigkeit, nämlich mit *2,4-Xylyl-*, *Phenyl-* und *p-Nitrophenyl-jodoso-acetat* in Eisessiglösung behandelt. Die Reaktionen ließen sich bei 30° in kurzer Zeit ausführen und lieferten mit guter Ausbeute, wie bei der Oxydation mit Bleitetracetat, ein Gemisch von i. V. destillierbaren Estern. *Unter diesen waren die Glycolsäure-ester II auch nicht in kleinsten Mengen vorhanden.* Vielmehr lag ein Gemisch von Essigsäure-estern von verschiedenen Cyclopentendiolen vor, aus dem diese letzteren leicht durch Verseifung gewonnen und durch Hydrierung in ein Gemisch von Cyclopentan-diolen übergeführt werden konnten. Der Gehalt an *cis-* und *trans*-Cyclopentan-1,2-diol wurde durch *kinetische Analyse* mit Hilfe von Bleitetracetatlösung bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstante der Oxydation des *cis*-Diols liegt über 30000, während das *trans*-Isomere mit einer Konstante von 12,8 gespalten wird. Ersteres Diol wird also in wenigen Sekunden oxydiert, während das *trans*-Diol zur völligen Oxydation etwa 15 Minuten gebraucht.

Es zeigte sich nun überraschenderweise, daß in allen 3 Fällen die Summe an *cis-* und *trans*-1,2-Diol *nur etwa die Hälfte der gesamten Diolmenge* ausmachte. Die andere Hälfte bestand aus Diolen, die nicht mit Bleitetracetat reagierten, also keine benachbarten OH-Gruppen enthielten. Es konnte sich nur um die isomeren 1,3-Diole handeln, die durch Addition von 2 Acetoxylgruppen an die Enden des konjugierten Systems des Cyclopentadiens entstanden waren:



Diese gleichzeitige 1,4-Addition war früher bei der Oxydation von Dienen mit *Bleitetracetat* nicht beobachtet worden; allerdings stand damals noch nicht die Glycolspaltung als Reagens auf die Zusammensetzung des Diolgemisches zur Verfügung. Wir wiederholten daher jetzt die Oxydation von Cyclopentadien mit Bleitetracetat und fanden, daß *auch in diesem Falle neben 1,2- auch 1,4-Addition stattfindet.* Tab. 1 zeigt im einzelnen die Zusammensetzung der Diole, die unter den verschiedenen Oxydationsbedingungen erhalten wurden.

Tabelle 1.

Oxydationsmittel	Zusammensetzung des erhaltenen Diolgemisches			
	1,2-Diol %	1,3-Diol %	vom 1,2-Diol	
			cis in %	*trans* in %
Xylyl-jodoso-acetat	60	40	53	47
Phenyl-jodoso-acetat[1]) . . .	49	51	59	41
p-Nitrophenyl-jodoso acetat .	43	57	41	59
Bleitetracetat (Eisessiglösg.)[2])	57	43	76	24
„ (Benzollösung)	81	19	96	4

Die Zahlen zeigen, daß in allen Fällen ein kompliziert zusammengesetztes Reaktionsgemisch entsteht. In der Reihe der Jodosoacetate scheint mit abnehmender Reaktionsgeschwindigkeit der Anteil an 1,2-Addition ab-, der an 1,4-Addition zuzunehmen; doch sind die Effekte nicht besonders stark. Noch weniger klar ist der Einfluß des Oxydationsmittels auf das Verhältnis von *cis-* und *trans*-Addition. Nur bei Verwendung von Bleitetracetat überwiegt die *cis*-Addition, ganz besonders bei Oxydation in Benzollösung.

[1]) Vgl. Anm. 1 auf S. 234.

[2]) Die Zahlen bei den Bleitetracetat-Versuchen beziehen sich auf die Zusammensetzung der gesamten Reaktionsprodukte. Untersucht man dagegen die beiden Hauptfraktionen, die sich bei der Oxydation in Eisessiglösung bilden, nämlich die der Essigsäureester und die der Essigsäure-glycolsäureester, getrennt, so erhält man folgende Werte:

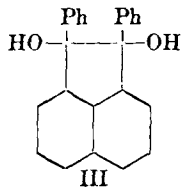
Fraktion I	70%,	30%;	84%,	16%
Fraktion II	52%,	48%;	71%,	29%

Das Gemisch der *cis*- und *trans*-Cyclopentan-1,3-diole wurde isoliert, indem das rohe Diolgemisch mit der zur Zerstörung der 1,2-Diole ausreichenden Menge Bleitetracetat behandelt wurde. Es stellt ein viscoses farbloses Öl dar, aus dem mit Phenylisocyanat zwei verschiedene Bis-phenylurethane 173° und 143° gewonnen werden konnten.

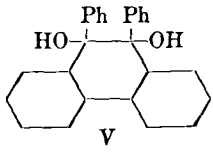
Der zweite Teil der Untersuchung galt der *Glycolspaltung* durch Jodosoacetate. Dabei waren — im Gegensatz zur Oxydation der Kohlenwasserstoffe — keine verschiedenartigen Reaktionsprodukte möglich; vielmehr interessierte hier nur der Unterschied in den Reaktionsgeschwindigkeiten. Zunächst wurde eine Reihe von Diolen mit Phenyl-jodosoacetat oxydiert und die dabei erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten mit den mit Bleitetracetat erhaltenen verglichen. Im Gegensatz zur Oxydation von Anethol verläuft die Glycolspaltung mit den Jodosoverbindungen streng bimolekular. Tab. 2 gibt einen Überblick über die erhaltenen Zahlen:

Tabelle 2.

Diol	k_{20} der Oxydation mit		Verhältnis
	Bleitetracetat	Phenyl-jodoso-acetat	
cis-Diphenyl-acenaphten-diol (III)	33 000	115	287
Isohydrobenzoin (IV)	2 820	0,28	10 000
cis - Diphenyl - dihydro - phenanthren-diol (V)	286	0,073	3 900
trans - Diphenyl - acenaphten - diol (III)	284	1,21	236
trans - Diphenyl - dihydro - phenanthren-diol (V)	24,7	0,0084	2 900
cis-Dekalin-9,10-diol (VI)	15,0	0,0004	40 000
cis-Cyclohexan-diol.	5,04	0,0008	6 000
trans-Cyclohexan-diol	0,224	sehr klein	—



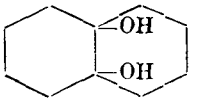
III

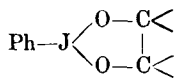


V

Ph—CH(OH).CH(OH)—Ph

IV

VI 

VII 

Daraus lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Die Oxydation mit Phenyl-jodoso-acetat verläuft in allen Fällen langsamer als die mit Bleitetracetat.

2. Das Ausmaß der Verlangsamung ist im einzelnen sehr verschieden; es liegt zwischen 200 und 40000. Bei isomeren Glycolen ist es aber der Größenordnung nach gleich.

3. Auch durch Jodosoacetate werden *cis*-Glycole immer schneller gespalten als die *trans*-Glycole. Der Unterschied ist — wie mit Bleitetracetat — bei dem 5-Ring-Isomerenpaar III größer als bei dem 6-Ring-Paar V. Es werden also hier in der gleichen Weise cyclische Zwischenprodukte — etwa der Formel VII — auftreten, wie man sie bei der Bleitetracetatoxydation von Diolen annehmen muß.

Wir gingen nun dazu über, ein Diol — und zwar der bequemen Meßbarkeit halber das *Isohydrobenzoin* (IV) — mit den *verschiedenen Jodosoacetaten* zu oxydieren. Tab. 3 zeigt die bei 20° gefundenen Geschwindigkeitskonstanten.

Tabelle 3.

Jodosoacetat	Isohydrobenzoin		Anethol
	k_{20}	Halbwertszeit in $^{m}/_{20}$-Lösung in Minuten	
o-Nitrophenyl-*	23,7	0,8	—
2,4,6-Tribromphenyl-*	21,2	1	—
m-Nitrophenyl-	2,55	8	166
p-Nitrophenyl-	2,51	8	255
p-Phenylsulfo-phenyl-	—	—	170
Chloräthylen-	1,73	11,5	164
Phenyl-	0,28	71	47
m-Tolyl-	0,24	84	28
p-Tolyl-	0,22	88	20
o-Tolyl-	0,17	117	42
2,4-Xylyl-	0,13	148	26
2,6-Xylyl-*	0,07	270	—

Die mit * versehenen Substanzen sind von Herrn Walther (vgl. eine folgende Abhandlung) gemessen worden.

Auch hier ist also ein großer Einfluß der Konstitution des Oxydationsmittels auf die Oxydationsgeschwindigkeit vorhanden. Sehr bemerkenswerterweise ist aber die Richtung, in der ein Substituent im Oxydationsmittel die Geschwindigkeit der Glycolspaltung verändert, *genau umgekehrt* als er die Anlagerungsgeschwindigkeit bei Anethol beeinflußt. Das zeigt eine in den beiden letzten Spalten der Tab. 3 vorgenommene Gegenüberstellung der unter gleichen Bedingungen gemessenen *Halbwertszeiten* der beiden Reaktionsarten: Je schneller die Reaktion mit Isohydrobenzoin, desto langsamer diejenige mit Anethol. Nur kleine Abweichungen treten von dieser Regel auf. Natürlich darf man das wesentlich andersartige Bleitetracetat nicht in diese Reihe aufnehmen; bei ihm betragen die Halbwertszeiten unter gleichen Bedingungen 0,006 bzw. 87 Minuten.

Diese Ergebnisse zeigen wieder einmal mit aller Deutlichkeit, daß von einem *allgemeinen* Zusammenhang zwischen Potential und Geschwindigkeit nicht die Rede sein kann, und es erhebt sich nun die Frage, in welcher der beiden Reaktionen die beiden Größen zusammengehen. Wir möchten glauben, daß es im Sinne der vorhin gemachten Annahme die Reaktion der Oxydationsmittel mit der *Doppelbindung* ist. Denn die Glycolspaltung hat nach den früheren Untersuchungen (a. a. O.) einen Mechanismus, bei dem das Potential des Oxydationsmittels keine entscheidende Rolle spielt. Die ersten Phasen der Reaktion, die im wesentlichen die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmen, verlaufen vielmehr so, daß die Acetatreste des Bleitetracetats einer *Alkoholyse* durch die OH-Gruppen des Diols unterliegen. Gilt das auch für die Oxydation mit den Jodosoacetaten, dann wird diese Alkoholyse — wie jede Hydrolyse — um so vollständiger verlaufen und damit also die Reaktionsgeschwindigkeit der Gesamtreaktion um so mehr zunehmen, *je schwächer die dem Jodosoacetat zugrunde liegende Base ist.* Nun ist die Basenstärke der Jodosoverbindungen unbekannt; man kann aber durch Analogie mit anderen Arten von organischen Basen schließen, daß sie durch Methylgruppen erhöht, durch Nitrogruppen erniedrigt wird. Das stimmt aber völlig mit der

beobachteten Reihenfolge der Oxydationsgeschwindigkeit überein: Nitrophenyl-jodoso-acetate als Salze der schwächeren Basen hydrolysieren stärker und oxydieren daher Glycole schneller als die Tolyl- oder Xylyl-jodoso-acetate, denen wesentlich stärkere Basen zugrunde liegen. Der besonders großen Oxydationsgeschwindigkeit des *ortho*-Nitrophenyl-jodoso-acetats entspricht die besonders kleine Dissoziationskonstante des *ortho*-Nitranilins, die fast zwei Zehnerpotenzen niederer liegt als die des para-Isomeren.

Stimmt diese Auffassung, daß ein Zusammenhang zwischen der Leichtigkeit der Hydrolyse der Jodosoacetate mit ihrer Oxydationsgeschwindigkeit gegenüber Glycolen besteht, dann sollte auch die *Stärke der Säure*, die dem Salz einer Jodosobase zugrunde liegt, von wesentlichem Einfluß sein. Wir verglichen also die Oxydationsgeschwindigkeit des Phenyljodoso-*acetats* mit denen des Mono-, Di- und Trichloracetats. Diese Messungen wurden — um ein gemeinsames Lösungsmittel zu haben — in *Benzollösung* durchgeführt. Bei Verwendung von Bleitetracetat wird, wie früher gezeigt, durch den Übergang von Eisessig zu Benzol als Lösungsmittel die Oxydationsgeschwindigkeit außerordentlich stark — um mehr als das Tausendfache — vergrößert. Das rührt von dem der eigentlichen Oxydation vorgelagerten Gleichgewicht,

I Bleitetracetat + Diol $\rightleftarrows$ Zwischenprodukt + Essigsäure,

her, bei dem die Essigsäure auf der rechten Seite die Konzentration des Zwischenproduktes zurückdrängt und daher die Gesamtreaktion hemmt. Bei der Oxydation mit Jodosoacetaten sollte entsprechend das Gleichgewicht

II Jodosoacetat + Diol $\rightleftarrows$ Zwischenprodukt + Essigsäure

bestehen. Tatsächlich wirkt auch hier die Beseitigung der Essigsäure durch den Übergang zum Lösungsmittel Benzol beschleunigend, aber das Ausmaß der Beschleunigung ist viel geringer; sie beläuft sich nur auf das Siebenfache. Vielleicht ist das damit zu erklären, daß die Jodosoacetate noch weniger stark ausgeprägten Salzcharakter haben als Bleitetracetat, und daß daher das Gleichgewicht II sich nur

langsam einstellt, also im Verlauf der Oxydation nicht voll zur Wirkung kommt.

Damit stimmt nun auch das Verhalten der Chlor-, Dichlor- und Trichlor-essigsäurederivate überein. Man sollte einmal erwarten, daß das Gleichgewicht II um so mehr auf der linken Seite liegt, und damit die Gesamtreaktion um so mehr verlangsamt werden sollte, je schwächer die verwendete Säure ist. Andrerseits nimmt der salzartige Charakter der Jodososalze sicher mit steigender Stärke des Säurebestandteils zu, so daß die Einstellungsgeschwindigkeit des Gleichgewichts in dieser Richtung ebenfalls anwächst. Beide Einflüsse müssen also gegeneinander wirken und Tabelle IV zeigt, daß tatsächlich kein einfacher Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit und Stärke der Säure herrscht.

Tabelle IV.

Oxydation von Isohydrobenzoin in Benzollösung mit den Salzen von Jodosobenzol.

	k_{20}
Acetat	2,0
Chlor-acetat	9,4
Dichlor-acetat	10,4
Trichlor-acetat	8,3

Jodidchloride sind zur Glycolspaltung nicht fähig, während freies *Jodosobenzol* trotz seiner Unlöslichkeit in allen Lösungsmitteln die Reaktion glatt ausführt.

Bleitetracetat vermag nicht nur α-Glycole, sondern auch *α-Oxysäuren* und *Oxalsäure* oxydativ zu spalten[1]). Das gleiche gilt für die Jodosoacetate und besonders für das freie Jodosobenzol. Das ist besonders interessant in Hinblick auf die Tatsache, daß *Perjodsäure*, die auf Glycole in gleicher Weise wie die genannten Oxydationsmittel wirkt, Oxalsäure überhaupt nicht und Oxysäuren höchstens außerordentlich langsam oxydiert. Der Grund dafür wurde früher schon

[1]) Criegee, Kraft u. Rank (a. a. O.); Oeda, Bull. chem. Soc. Japan **9**, 8 (1934).

einmal erwähnt[1]): Auch bei der Spaltung der Oxalsäure müssen als Zwischenprodukte cyclische Verbindungen mit dem Oxydationsmittel gebildet werden; nun ist die Bildung eines Blei(IV)-oxalats oder eines Jodoso-oxalats ein durchaus möglicher Vorgang; man kann aber nicht erwarten, daß Perjod-*säure* und Oxal-*säure* sich in *wäßriger* Lösung zu einem cyclischen Säure-*anhydrid* vereinigen; damit fehlt aber die Möglichkeit zu jeder weiteren Reaktion.

Wir haben auch die *Geschwindigkeit* der Oxalsäureoxydation durch drei verschiedene Jodosoacetate in Eisessiglösung gemessen. Tabelle V zeigt, daß die Reihenfolge in den Geschwindigkeiten hier wieder umgekehrt wie bei der Oxydation der Glycole ist:

Tabelle V.

Jodosoacetat	k_{20} (Oxalsäure)
p-Nitrophenyl-	2,45
Phenyl-	7,33
2,4-Xylyl-	15,2

Das ist wohl nur folgendermaßen zu erklären: Wie Hydroxyde in Wasser, so haben Acetate (also auch die Jodosoacetate) in Eisessig den Charakter von *Basen.* Die der Spaltung vorhergehende Reaktion

Jodosoacetat + Oxalsäure $\rightleftharpoons$ Jodoso-oxalat + Essigsäure

hat also für das Lösungsmittel Eisessig die Bedeutung einer *Neutralisations*reaktion. Das Gleichgewicht wird also hier um so weiter rechts liegen (und damit wieder die Oxydationsgeschwindigkeit um so größer sein), je *stärker* das Jodosoacetat als Base ist.

Zum Schluß sei noch darauf hingewiesen, daß auch, abgesehen von einer gewissen Verschiedenartigkeit in der Wirkung, die Jodosoacetate als Oxydationsmittel unter Umständen Vorteile vor Bleitetracetat voraushaben. Einmal bleibt bei den Reaktionen kein anorganischer Rückstand [die

[1]) Criegee, S. B. Ges. Beförd. ges. Naturwiss., Marburg **69**, 25 (1934).

Entfernung von Blei(II)-acetat bereitet manchmal Schwierigkeiten]: Das als Reduktionsprodukt entstehende Jodbenzol kann im Vakuum oder mit Wasserdampf abdestilliert werden; besonders leicht ist die Abtrennung von p-Nitrojodbenzol, das in kaltem Eisessig praktisch unlöslich ist und daher nach Beendigung der Reaktion fast quantitativ auskrystallisiert. Dann ist aber vor allem die bei Blei(II)-acetat nur teilweise durchführbare und daher unrentable Regenerierung des Oxydationsmittels bei den Jodverbindungen über die Jodidchloride hinweg leicht möglich. Als Nachteil ist dagegen die verhältnismäßig geringe und durch Wechsel des Lösungsmittels nur wenig zu beeinflussende Oxydationsgeschwindigkeit gegenüber den Glycolen zu erwähnen.

Beschreibung der Versuche[1]).

Darstellung der Jodosoacetate.

Die Jodosoacetate wurden fast alle nach den Angaben von Willgerodt, also aus den Jodidchloriden über die Jodobasen, hergestellt. In einzelnen Fällen[2]) wurden auch die Jodidchloride durch Umsetzung mit Bleiacetat direkt in die Acetate übergeführt; dies Verfahren ist auch von Neu (a. a. O.) angewandt worden. Zur Reinigung wurden die Acetate in wenig absolutem Benzol, das zur Vermeidung von Hydrolyse einige Tropfen Eisessig enthielt, unter Erwärmen gelöst; nach dem Filtrieren wurde Petroläther bis zur beginnenden Krystallisation zugesetzt. Noch nicht beschrieben sind folgende Verbindungen:

Monochloracetat von Jodosobenzol. Durch Verreiben von 11,5 g Jodosobenzol mit 10 g Chloressigsäure im Mörser. Nach dem Trocknen auf Ton wurde aus Benzol krystallisiert. Farblose Nadeln vom Zersetzungsp. 116°; Ausbeute 12 g = 65 Proz.

0,0970 g Subst.: 4,951 ccm $^n/_{10}$-Thiosulfat.

$C_{10}H_9O_4Cl_2J$ Äquiv.-Gew. Ber. 195,4 Gef. 195,9.

Dichloracetat von Jodosobenzol. 7 g Jodosobenzol wurden in eine konz. Lösung von 8 g Dichloressigsäure in Benzol eingetragen. Das Jodosobenzol ging sofort in Lösung, dann trübte sich diese durch Abscheidung von Wasser und schied außerdem das krystallisierte Dichloracetat ab. Nach dem Abfiltrieren und Trocknen wurde aus Benzol krystallisiert. Zersetzungsp. 112°.

0,0936 g Subst.: 4,07 ccm $^n/_{10}$-Thiosulfat.

$C_{10}H_7O_4Cl_4J$ Äquiv.-Gew. Ber. 229,9 Gef. 230,6.

---

[1]) Alle Einzelheiten vgl. Dissertation Beucker, Marburg 1937.

[2]) Dissertation Walther, Karlsruhe 1939.

Das reine *Trichloracetat des Jodosobenzols* konnte auf keine Weise gewonnen werden. Die erhaltenen Produkte änderten beim Umkrystallisieren stets ihre Zusammensetzung in Richtung auf ein basisches Salz. Zu den kinetischen Messungen wurde daher eine benzolische Lösung, die die berechneten Mengen Jodosobenzol und Trichloressigsäure enthielt, benutzt.

Reaktion von Anethol mit den Jodosoacetaten.

6,8 g m-Tolyl-jodoso-acetat reagierten mit 3 g Anethol in 10 ccm Eisessig unter schwacher Selbsterwärmung. Das Reaktionsprodukt wurde sofort verseift und das Gemisch der dabei entstehenden stereoisomeren Anetholglycole durch Glycolspaltung in Anisaldehyd übergeführt, der durch sein Phenylhydrazon vom Schmelzp. 122° identifiziert wurde.

Die *kinetischen Messungen* wurden mit einem Anethol von Schimmel (Schmelzp. 21°) ausgeführt. Als Lösungsmittel diente über CrO_3 gereinigter Eisessig vom Schmelzp. 15,6—15,7°. Die Temperatur war in allen Fällen 20,0 ± 0,1°. Als Stoplösung diente eine 2-proc. wäßrige KJ-Lösung, die zur besseren Haltbarkeit mit einer Spur Natriumacetat versetzt war. Je 5 ccm der $^1/_{10}$-molaren Lösungen beider Reaktionspartner in Eisessig wurden schnell zusammengegeben und nach bestimmten Zeiten je 1 ccm herauspipettiert, mit 5 ccm Stoplösung versetzt und nach dem Verdünnen mit Wasser mit $^n/_{10}$-Thiosulfat unter Benutzung von Mikrobüretten titriert. Als Beispiel für die ausgeführten Messungen seien folgende gebracht:

Phenyl-jodoso-acetat und Anethol.
$a = b = 0{,}500$; $t = 20°$.

Min.	ccm $^n/_{10}$-Thiosulfat	„k" (bimolek.)	Min.	ccm $^n/_{10}$-Thiosulfat	„k" (bimolek.)
0	1,000	—	45	0,510	0,43
5	0,868	0,61	60	0,447	0,41
10	0,788	0,54	75	0,399	0,40
25	0,633	0,47	90	0,358	0,40
35	0,564	0,44			

Die Geschwindigkeit der Reaktion *Bleitetracetat*–Anethol kann nicht auf dem gleichen Wege gemessen werden. Denn während Anethol unter den obigen Versuchsbedingungen nicht mit ausgeschiedenem Jod reagiert, tritt bei Gegenwart von Blei (II)-acetat, in geringerem Ausmaß auch schon bei Gegenwart von viel Natriumacetat, ein starker und schneller

Jodverbrauch ein. Offenbar reagieren Bleiacetat und Jod miteinander bis zu einem Gleichgewicht, etwa im Sinne folgender Gleichung:

$$Pb(OCOCH_3)_2 + J_2 \rightleftarrows Pb(OCOCH_3)J + J.OCOCH_3$$

und das dabei gebildete Misch-Pseudohalogen lagert sich viel schneller an die Doppelbindung des Anethols an, als es Jod alleine tut.

Daher wurde bei der kinetischen Messung nicht wie sonst die Abnahme des Oxydationsmittels sondern die des Anethols, und zwar durch Titration mit einer Brom–Eisessig-Lösung, bestimmt. Diese Lösung muß frisch bereitet sein und darf keinen Bromwasserstoff (der durch Bleitetracetat zu Brom oxydiert werden würde) enthalten. Die Titration muß sehr schnell ausgeführt werden, da das entstehende Dibromid sonst Bromwasserstoff abspaltet. Die erhaltenen Werte sind weniger genau als bei den vorhergehenden Messungen, genügen aber doch zum Vergleich. Im Gegensatz zu diesen wurde für jede Zeit ein eigener Ansatz ausgeführt.

Je 5 ccm der 0,05-molaren Eisessiglösungen beider Reaktionspartner wurden zusammengegeben und nach bestimmten Zeiten schnell mit $^n/_{10}$-Brom-Eisessiglösung bis zur eben bleibenden Gelbfärbung versetzt.

Bleitetracetat und Anethol.

$a = b = 0{,}025$; $t = 20°$.

Min.	ccm $^n/_{10}$-Brom	„k“ (bimolek.)	Min.	ccm $^n/_{10}$-Brom	„k“ (bimolek.)
0	5,00	—	280	1,92	0,23
35	4,05	0,27	360	1,68	0,22
70	3,45	0,26	540	1,38	0,19
100	3,26	0,21	1055	0,83	0,19
210	2,26	0,23			

Phenyl-jodoso-acetat und Cyclopentadien.

26 g frisch destilliertes Cyclopentadien wurden im Laufe von 3 Stunden zu einem turbinierten Gemisch von 100 g Phenyl-jodoso-acetat und 100 ccm Eisessig zugetropft. Die Temperatur stieg durch die Reaktionswärme langsam an und wurde durch Kühlung um 30° gehalten. Nach dem

Stehen über Nacht wurde das Reaktionsgemisch 2-mal i. V. fraktioniert.

Fraktion I: Eisessig, verunreinigt mit Cyclopentadien; Fraktion II, Siedep.$_{13}$ 74—76°: Jodbenzol; Fraktion III, Siedep.$_{12}$ 109—118°: Gemisch der verschiedenen Cyclopenten-diol-diacetate.

Diese Fraktion betrug 32,5 g, das sind 57 Proc., bezogen auf das angewandte Oxydationsmittel. Als Rückstand blieb eine zähe braune Masse[1]). Fraktion III wurde durch Schütteln mit 1-n wäßriger Kalilauge verseift. Die klare wäßrig-alkalische Lösung wurde neutralisiert und mit Chloroform $1^1/_2$ Tage kontinuierlich extrahiert[2]). Erhalten wurden 8,5 g eines Gemisches von Cyclopendiolen vom Siedep.$_{12}$ 120 bis 131°. Dies Gemisch wurde in alkoholischer Lösung bei Gegenwart von Pt-schwarz hydriert. Das Gemisch der gesättigten Diole siedete unter 13 mm von 118—123°.

Zur kinetischen Analyse wurde eine $^m/_{20}$-Lösung in Eisessig hergestellt und die Geschwindigkeit von deren Umsetzung mit einer $^m/_{20}$-Bleitetracetat-Lösung gemessen. Wegen der großen Geschwindigkeiten wurde in der früher beschriebenen Weise[3]) in Dreischenkelrohren gearbeitet.

Diol-Gemisch und Bleitetracetat.
$a = b = 0{,}025$; $t = 20°$.

Minuten	ccm $^n/_{10}$-Thiosulfat	Minuten	ccm $^n/_{10}$-Thiosulfat
0	1,000	3	0,614
0,066	0,710	6	0,576
0,25	0,703	16	0,525
0,50	0,692	33	0,508
1	0,672	180	0,510

[1]) Der Rückstand wurde hier und in allen andern Fällen mit äthylalkoholischer Kalilauge verseift. In keinem Fall schied sich schwerlösliches Kaliumglycolat ab.

[2]) Wie sich später herausstellte, sind zur völligen Extraktion der Diole mindestens 14 Tage nötig. Da die verschiedenen Bestandteile des Diol-Gemisches sicher nicht gleich schnell extrahiert werden, ist die ermittelte Zusammensetzung des $1^1/_2$-Tage-Extraktes nicht streng mit den Zusammensetzungen zu vergleichen, die die mit den andern Oxydationsmitteln gewonnenen Diol-Gemische besitzen.

[3]) A. **495**, 218 (1932).

Im ganzen wurden also nur 49 Proc. der berechneten Menge Bleitetracetat verbraucht; 51 Proc. des Gemisches bestehen daher aus 1,3-Diol. Etwa 29—30 Proc. der Gesamtmenge werden im Laufe von wenigen Sekunden oxydiert; dieser Anteil besteht aus *cis*-1,2-Diol.

p-Nitrophenyl-jodoso-acetat und Cyclopentadien.

In gleicher Weise wurden 15 g Cyclopentadien mit 73,4 g p-Nitrophenyl-jodoso-acetat in 75 ccm Eisessig zur Umsetzung gebracht. Nach 2-tägigem Stehen hatten sich 48,6 g (ber. 49,8) p-Nitrojodbenzol krystallisiert abgeschieden. Durch Destillation i. V. wurden 27,2 g (74 Proc.) an Cyclopentendiol-diacetaten gewonnen, die nach der Verseifung durch 14-tägige Extraktion mit Chloroform 10,9 g (73 Proc.) an Cyclopentendiolen lieferten. Nach der Hydrierung wurde wieder die kinetische Analyse ausgeführt, deren Ergebnis im theoretischen Teil gebracht wurde.

2,4-Xylyl-jodoso-acetat und Cyclopentadien.

17 g Cyclopentadien wurden mit 70 g des Oxydationsmittels in 75 ccm Eisessig zur Umsetzung gebracht. Die Aufarbeitung durch fraktionierte Destillation ist hier nicht möglich, weil das entstandene Jodxylol im selben Bereich siedet wie die Reaktionsprodukte. Daher wurde nach dem Abdestillieren des Eisessigs mit wäßriger Kalilauge verseift. Die dabei entstandenen Diole lösen sich spielend in der wäßrigen Schicht während das Jodxylol im Scheidetrichter abgetrennt werden kann. Durch 14-tägige Extraktion mit Chloroform wurden 10,5 g Diolgemisch (52 Proc.) gewonnen und wie bisher weiterverarbeitet.

Isolierung von Cyclopentan-1,3-diol.

11,3 g eines Gemisches von Cyclopentan-1,2- und 1,3-diolen (aus den Versuchen mit Phenyl- und p-Nitrophenyljodoso-acetat), dessen Zusammensetzung durch kinetische Analyse ermittelt worden war, wurden in 50 ccm Eisessig mit der zur Zerstörung des 1,2-Diols ausreichenden Menge Bleitetracetat oxydiert und der entstandene *Glutardialdehyd* mit der ebenfalls berechneten Menge 2,4-Dinitrophenylhydrazin gefällt. Nach $^1/_2$ Stunde wurde das Ganze in Wasser gegossen und filtriert. Das Filtrat wurde mit Natriumbicarbonat neutralisiert, dann wurde vom ausgefallenen Bleicarbonat abgesaugt und das klare Filtrat mit

Chloroform 5 Tage extrahiert. Nach dem Verdampfen des Chloroforms wurde i. Hochv. destilliert. Siedep.$_1$ 85—93°. Ausbeute 1,6 g. Farbloses, viscoses Öl, das teilweise erstarrt.

0,05675 g Subst.: 0,1231 g CO_2, 0,0491 g H_2O.

$C_5H_{10}O_2$ Ber. C 58,82 H 9,87 Gef. C 59,16 H 9,68.

Reagiert nicht mit Bleitetracetat. Oxydation mit konz. Salpetersäure gab *Bernsteinsäure*, während aus dem 1,2-Diol Glutarsäure entsteht. Durch Erwärmen mit der berechneten Menge Phenyl-isocyanat wurde das *Bis-phenylurethan* hergestellt. Durch häufiges Umkrystallisieren aus Toluol ließen sich zwei isomere Produkte von den Schmelzp. 173 und 143° gewinnen, die wohl den beiden stereoisomeren Formen zugehören.

I. 0,0275 g Subst. (Schmelzp. 173°): 0,0674 g CO_2, 0,0147 g H_2O. — II. 0,0242 g Subst. (Schmelzp. 143°): 0,0598 g CO_2, 0,0143 g H_2O.

$C_{19}H_{20}O_4N_2$ Ber. C 67,02 H 5,92
Gef. „ I: 66,88, II: 67,30 „ I: 5,96 II: 6,15.

Dasselbe Gemisch der 1,3-Diole und dieselben Phenylurethane wurden aus Versuchsansätzen isoliert, bei denen Cyclopentadien mit Bleitetracetat oxydiert worden war.

Glycolspaltung mit Jodosoacetaten.

1,88 g *Hydrobenzoin* wurden in 50-proc. Essigsäure mit 3,2 g Phenyl-jodoso-acetat versetzt. Nach einiger Zeit, als alles Oxydationsmittel verbraucht war, wurde mit Phenylhydrazin versetzt. Ausbeute an reinem Benzaldehyd-phenylhydrazon (ohne Aufarbeitung der Mutterlaugen) 2,06 g = 62 Proc.

0,94 g *Hydrobenzoin* wurden mit 1,15 g *Jodosobenzol* in 80 ccm Benzol 3 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Beim darauffolgenden Durchschütteln mit Bisulfitlauge wurden 1,54 g = 78 Proc. der Bisulfitverbindung des Benzaldehyds gewonnen.

Zum Schluß geben wir noch einige Beispiele von kinetischen Messungen von Jodosoacetaten mit Glycolen bzw. Oxalsäure. Die Methodik war dieselbe wie bei der Reaktion der Jodosoverbindungen mit Anethol.

Chloräthylen-jodoso-acetat und Isohydrobenzoin.

$a = b = 0{,}100$; $t = 20°$; Dreischenkelrohre.

Minuten	ccm $^n/_{10}$-Thiosulfat	k (bimolekular)
0	2,00	—
4	1,49	1,72
5	1,39	1,76
6	1,31	1,76
8	1,19	1,70
11	1,03	1,72
12	0,98	1,73
13	0,94	1,71
15	0,88	1,71
17	0,82	1,70
20	0,74	1,75
		k_{20}: 1,73

Phenyljodoso-dichloracetat und Isohydrobenzoin.

Lösungsmittel: *Benzol*; Stoplösung: 2 Proc. KJ in *Methanol*, das außerdem 5 Proc. Eisessig enthielt.

$a = b = 0{,}0250$; $t = 20°$; Dreischenkelrohre.

Minuten	ccm $^n/_{10}$-Thiosulfat	k (bimolekular)
0	0,500	—
5	0,316	9,3
6	0,283	10,2
7	0,266	10,1
8	9,251	10,0
9	0,231	10,4
10	0,220	10,2
12	0,192	10,7
15	0,158	11,4
18	0,144	11,0
		k_{20}: 10,4

p-Nitrophenyl-jodoso-acetat und Oxalsäure.

Lösungsmittel: Eisessig; $a = b = 0{,}100$; $t = 20°$; Dreischenkelrohre.

Minuten	ccm $^n/_{10}$-Thiosulfat	k (bimolekular)
0	2,00	—
5	1,24	2,43
7	1,07	2,45
8	1,00	2,46
9	0,94	2,47
10	0,90	2,46
12	0,81	2,44
13	0,77	2,47
		k_{20}: 2,45

Mandelsäure und Jodosobenzol.

1,52 g Mandelsäure in 20 ccm Wasser wurden mit 2,5 g 91-proc. Jodosobenzol versetzt. Nachdem die erste, unter Erwärmung und CO_2-Entwicklung vor sich gehende Reaktion vorbei war, wurden 20 ccm Benzol zugefügt und 3 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Dann wurden die Schichten getrennt und die Benzolschicht mit Bisulfitlauge geschüttelt. Erhalten wurden 1,85 g = 88 Proc. an Bisulfitverbindung des Benzaldehyds.

[Mitteilungen aus dem Institut für organische Chemie der Technischen Hochschule Dresden.]

(Eingelaufen am 29. August 1939.)

Studien in der Thiophenreihe. IL[1].

Die Konstitution der Indophenine;

von *Wilhelm Steinkopf* und *Werner Hanske.*

Mit 1 Figur im Text.

Vor 60 Jahren hat Baeyer[2]) das Indophenin entdeckt; seine Konstitution ist bis heute noch nicht bewiesen. Die von Schlenk[3]) aufgestellte, von G. Heller[4]) modifizierte Formel I zeichnet sich zwar dadurch aus, daß sie die Eigenschaften, insbesondere die Farbstoffnatur des Indophenins gut erklärt. Doch entsprachen gerade die von Schlenk vorgebrachten angeblichen Beweise nicht den Tatsachen[5]).

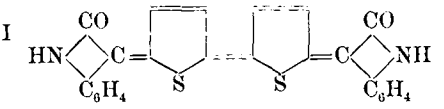
[1]) 47. u. 48. Mitteilung: A. **540**, 1 (1939). — Auf S. 15 Zeile 5 von oben lies: „2-Phenyl" statt „2-Thienyl".

[2]) B. **12**, 1311 (1879).

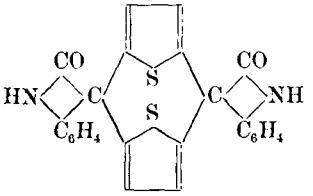
[3]) Schlenk u. Blum, A. **433**, 95 (1923).

[4]) Z. Ang. **37**, 1017 (1924).

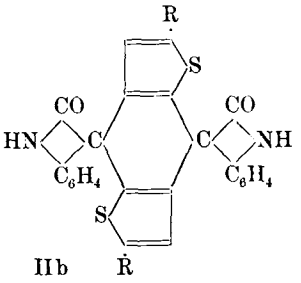
[5]) Steinkopf u. Roch, A. **482**, 251 (1930); Steinkopf u. Hempel, A. **495**, 144 (1932).



I



IIa



IIb

Diese Tatsachen sind:

1. Nur solche Thiophene bilden Indophenine, die in 2,5- oder in 2,3-Stellung freie H-Atome haben.

2. Als Kupplungskomponenten kommen nur Körper mit der Gruppierung –CO.CO– in Betracht.

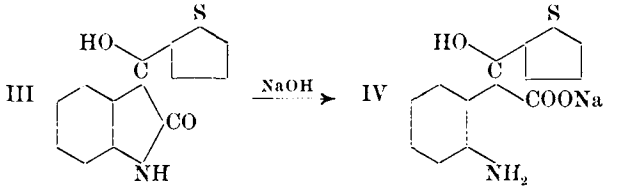
3. Die Reaktion geht nur unter Austritt von 2 Mol Wasser aus 2 Mol der Diketoverbindung und 2 Mol des Thiophenkörpers vor sich. Oxydation findet nicht statt.

Die von Steinkopf und Hempel[1]) aufgestellten Formeln IIa und IIb entsprechen allen diesen Anforderungen, vermögen aber ebensowenig wie die ähnliche Formulierung von Liebermann und Pleus[2]) die Farbstoffnatur der Indophenine befriedigend zu erklären. Wir haben daher nochmals versucht, durch Aufbau- und Abbaureaktionen zwischen den Formeln I und IIa bzw. IIb zu entscheiden; dabei hat sich herausgestellt, daß für die aus Thiophenen mit 2 freien α-H-Atomen entstehenden Indophenine, die wir als α-Indophenine bezeichnen, der seinerzeit rein intuitiv aufgestellte Formeltypus von Schlenk und Blum tatsächlich der richtige ist.

[1]) a. a. O.; Steinkopf u. Roch, A. **482**, 251 (1930). — Zur Nomenklatur der Indophenine [A. **495**, 145 (1932), Anm.]: Man nennt zweckmäßig zuerst die Dicarbonyl-, dann die Thiophenkomponente, also z. B. Benzil-[thiophen]-indophenin.

[2]) B. **37**, 2463 (1904).

Schon Steinkopf und Hempel haben den synthetischen Aufbau des *Isatin-[thiophen]-indophenins* über das *3-[2-Thienyl]-dioxindol* versucht, das sie aus 2-Thienylmagnesiumjodid und Isatin darstellen wollten[1]). Sie kamen aber zu keinem definierten Körper. Jetzt gelang die Darstellung durch Anwendung eines Überschusses an Jodthiophen. Das 3-[2-Thienyl]-dioxindol (III) läßt sich an der Imino- und



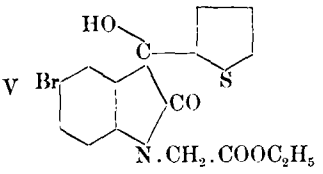
Hydroxylgruppe benzoylieren; heißes Natron spaltet zum Natriumsalz der *2-Thienyl-o-amino-mandelsäure* (IV), die sich diazotieren und mit β-Naphtol zu einem roten Farbstoff kuppeln läßt.

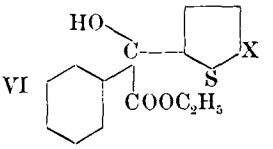
Durch Erhitzen mit Chlorzink bildet es einen dem Indophenin völlig ähnlichen Körper. Um aber die beiden miteinander vergleichen zu können, wurde zuerst versucht, reinstes Isatin-[thiophen]-indophenin darzustellen. Dabei zeigte sich, daß man das nach Steinkopf und Hempel[1]) durch Umküpen vorgereinigte Indophenin aus Pyridin oder Benzoesäureester umkrystallisieren kann. So wurde zum erstenmal, wenn man von der unreproduzierbaren Angabe v. Baeyers[2]) absieht, krystallisiertes Indophenin mit guten Analysenwerten erhalten. Das aus Thienyl-dioxindol erhaltene und krystallisierte Indophenin erwies sich dann mit obigem als völlig identisch.

Analog erhält man aus 2-Thienyl-magnesiumjodid und 5-Bromisatin-essigester das *5-Brom-3-[2-thienyl]-1-essigesterdioxindol* (V), aus dem sich krystallines *5-Brom-1-essigesterisatin-[thiophen]-indophenin* darstellen läßt, das dem von Steinkopf und Hempel[1]) gewonnenen in jeder Beziehung gleicht.

---

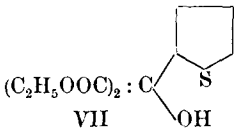
[1]) Vgl. Anm. 1, S. 239.
[2]) a. a. O.



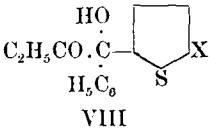


Auch *1-Methyl-* bzw. *5-Brom-3-[2-thienyl]-dioxindol*, die auf analoge Weise zu erhalten waren, geben mit Eisessig–Schwefelsäure die entsprechenden, nicht näher untersuchten Indophenine. Dagegen konnte gezeigt werden, daß der aus grignardiertem 2-Jodthiophen und Phenylglyoxylsäure-äthylester entstehende *α-[2-Thienyl]-mandelsäure-äthylester* (VI) (x = H) mit Schwefelsäure in dasselbe *Phenylglyoxylsäure-äthylester-[thiophen]-indophenin* übergeht, das man direkt aus Phenylglyoxylsäureester, Thiophen und Schwefelsäure erhält.

Da Mesoxalsäureäthylester mit Grignardverbindungen sowohl mit der CO-Gruppe wie mit den Carboxäthylgruppen reagieren kann, erhält man bei seiner Reaktion mit 2-Thienylmagnesiumjodid kein einheitliches Produkt. Es muß aber darin *[2-Thienyl]-tartronsäure-diäthylester* (VII) enthalten sein, denn mit Schwefelsäure bekommt man daraus das rote *Mesoxalsäureester-[thiophen]-indophenin*, das sich mit dem Mesoxophenin von Schlenk und Blum[1]) als identisch erweist.



VII



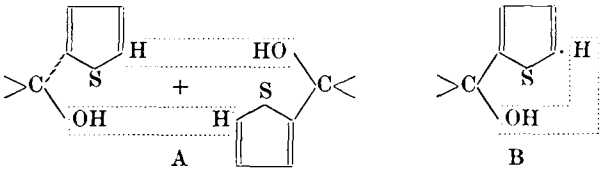
VIII

Alle diese Beispiele zeigen, daß die Bildung der Indophenine über die tertiären Alkohole der allgemeinen Form $O{=}\underset{R}{\overset{\cdot}{C}} . \underset{R'}{\overset{\cdot}{C}}{<}^{OH}_{C_4H_3S}$ geht, wobei bisher für R Aryl, Hydroxyl und OR, für R′ Aryl und COOR bekannt sind. R und R′ können auch Teile eines 5- oder 6-Ringes sein. Die Versuche beweisen außerdem eindeutig die zuerst von G. Heller[2]) behauptete Verknüpfung des Thiophens mit der β-ständigen

[1]) a. a. O. [2]) a. a. O.

Carbonylgruppe des Isatins, da dieses mit Grignardkörpern stets mit dieser Gruppe zu reagieren pflegt[1]).

Die Tatsache des intermediären Auftretens der tertiären Alkohole spricht zunächst mehr für die Indopheninformel II als für I. Denn bei der ungezwungenen Annahme, daß die Wasserabspaltung sich nach Schema A vollzieht, muß II entstehen. Nimmt man aber eine intramolekulare Wasser-



abspaltung nach B an, so könnte durch Zusammentreten zweier so entstehender Radikale an der freien α-Stellung und Verschiebung der Doppelbindungen die Bildung von I auch erklärt werden. Zur Entscheidung der Frage mußte durch Abbau die Anwesenheit eines Dithienylsystems in den Indopheninen bewiesen werden.

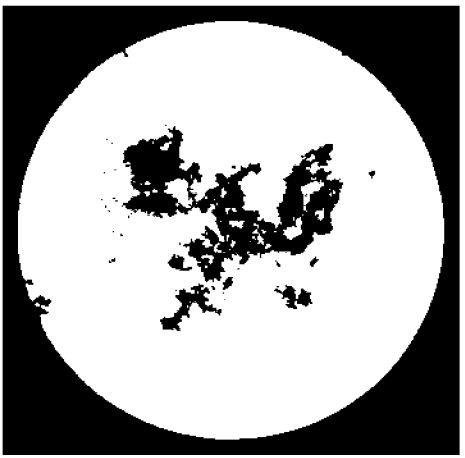
Dazu eignet sich das gewöhnliche Isatin-[thiophen]-indophenin nicht, weil dabei schwer zu identifizierende Abbauprodukte zu erwarten sind. So haben wir versucht, *Benzil-[thiophen]-indophenin* darzustellen. Daß Thiophen mit Benzil und Schwefelsäure Blaufärbung gibt, ist längst bekannt[2]). Es war aber nicht möglich, auf diese Weise das Indophenin in Substanz zu fassen. Wir sind deshalb wieder den Weg über die Grignardverbindung gegangen, nur war das aus Thienylmagnesiumjodid und Benzil zu erwartende *ms-[2-Thienyl]-benzoin* hier so zersetzlich, daß es nur durch den Kunstgriff, die Magnesiumverbindung bei Gegenwart von Diazomethan zu zersetzen, als beständiger Methyläther von VIII erhalten werden konnte. Mit Eisessig–Schwefelsäure gibt er unter Carbinolabspaltung das gewünschte Indophenin, außer dem Mesoxophenin das erste mit charakteristischem Schmelzpunkt und in gut ausgebildeten Nädelchen mit einer

[1]) Kohn, M. **31**, 749 (1910); Kohn u. Ostersetzer, M. **32**, 906 (1911); **34**, 1741 (1913).

[2]) V. Meyer, B. **16**, 2973 (1883).

Löslichkeit, die es erlaubte, durch Molekulargewichtsbestimmung die schon früher[1]) festgestellte Molekulargröße für die Indophenine nochmals zu bestätigen[2]).

Benzil-[thiophen]-indophenin läßt sich mit Zinkstaub und Eisessig zu einer in fester Form gegen Luft beständigen Leukoverbindung reduzieren, die 2 H-Atome mehr



Isatin-[thiophen]-indophenin aus Pyridin. 60-fach.

enthält als das Indophenin. In höher siedenden Lösungsmitteln oder besonders rasch durch Alkali[3]) wird sie wieder

[1]) Schlenk u. Blum sowie Steinkopf u. Hempel, a. a. O.

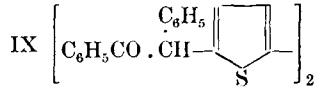
[2]) Beim vergeblichen Versuch, aus der blauen Lösung von Benzil, Thiophen und Schwefelsäure das Indophenin durch Chromatographieren zu isolieren, ließ sich *ms-Bis-[2-thienyl]-desoxybenzoin*, $C_6H_5CO.C(C_4H_3S)_2.C_6H_6$, erhalten, ein Zeichen dafür, daß auch unter den Bedingungen der „Indopheninreaktion" intermediär ein tertiärer Alkohol, hier das ms-[2-Thienyl]-benzoin, entsteht, das z. T. mit Thiophen unter Wasserabspaltung weiter reagiert.

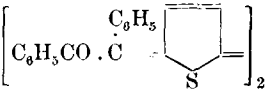
Das dem ms-[2-Thienyl]-benzoin analoge *ms-[2-Thienyl]-acetoin*, $CH_3CO.C(OH)(CH_3)(C_4H_3S)$ ließ sich aus 2-Thienylmagnesiumjodid und Diacetyl als ein im Hochvakuum destillierbares Öl erhalten, das sich in konz. Schwefelsäure blau löst unter Bildung eines unbeständigen, nicht näher untersuchten Indophenins.

[3]) Offenbar tritt durch Alkali Enolisierung zur Form $[C_6H_5.C(OH):C.(C_6H_5).C_4H_3S-]_2$ ein, die dann Oxydation zu X erleidet.

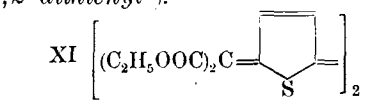
zum Farbstoff oxydiert. Mit Natriumalkoholat in Wasserstoff erleidet sie eine „Säurespaltung", die fast quantitativ nach der Gleichung $C_{36}H_{26}O_2S_2 + 2NaOH = C_{22}H_{18}S_2 + 2C_6H_5COONa$ unter Bildung von Benzoesäure und *5,5'-Dibenzyl-2,2'-dithienyl* verläuft. Das Dibenzyl-dithienyl konnte aus 5-Jod-2-benzylthiophen nach Ullmann synthetisiert werden.

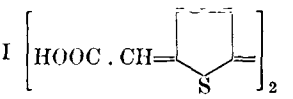
Es ist so zum erstenmal die Anwesenheit eines 2,2'-Dithienylsystems in einem Indophenin bewiesen. Die Leukoverbindung muß demnach *5,5'-Bis-[(phenyl-benzoyl)-methyl]-2,2'-dithienyl* (IX) sein, und der Farbstoff muß der Formel X entsprechen.

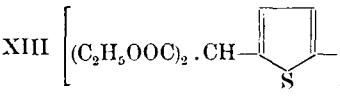
IX 

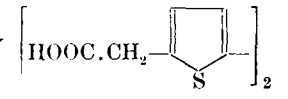
X 

Auch das Mesoxophenin (Mesoxalsäurediäthylester-[thiophen]-indophenin) ließ sich zu einem 2,2'-Dithienylderivat abbauen. Alkalische Verseifung gibt ein rotes Kaliumsalz, das nach der Mesoxopheninformel XI von Schlenk und Blum das Salz des *Glyoxylsäure-[thiophen]-indophenins* XII sein muß. Reduktion des Mesoxophenins gibt *2,2'-Dithienyl-5,5'-bis-[malonsäurediäthylester]* (XIII), der sich unter partieller Decarboxylierung zur *2,2'-Dithienyl-5,5'-bis-[essigsäure]* (XIV) verseifen läßt. Durch thermische Decarboxylierung erhält man daraus das bekannte *5,5'-Dimethyl-2,2'-dithienyl*[1]).

XI 

XII 

XIII 

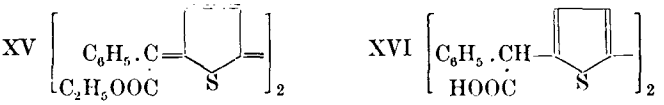
XIV 

Schließlich wurde analog das jetzt am leichtesten darstellbare *Phenylglyoxylsäure-äthylester-[thiophen]-indophenin* (XV) abgebaut[2]). Durch Verseifung und Reduktion bekommt

[1]) Steinkopf u. Roch, a. a. O.

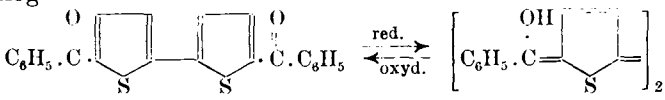
[2]) Claisen, B. **12**, 1505 (1879) hat schon vor der Entdeckung des Thiophens die rote Farbe beschrieben, die Phenylglyoxylsäure und ihre Ester mit Teerbenzol und Schwefelsäure geben.

man über die ebenfalls rote Indopheninsäure[1]) die *2,2'-Dithienyl-5,5'-bis-[-phenylessigsäure]* (XVI), die sich sehr leicht ebenfalls zum 5,5'-Dibenzyl-2,2'-dithienyl decarboxylieren läßt.



Übrigens läßt sich Phenylglyoxylsäure-[thiophen]-indophenin auch direkt in einer nicht aufgeklärten Reaktion zum 5,5'-Dibenzyl-2,2'-dithienyl thermisch decarboxylieren, indem offenbar Reduktion eines Teiles der Substanz auf Kosten eines anderen Teiles stattfindet.

Von diesem Indophenin führt noch ein anderer Weg zu einem Dithienylderivat. Läßt man seine alkalische Lösung längere Zeit stehen, so erhält man *5,5'-Dibenzoyl-2,2'-dithienyl* (XVII)[2]), identisch mit dem aus 2,2'-Dithienyl, Benzoylchlorid und Titantetrachlorid dargestellten Produkt. Der Mechanismus dieser Reaktion ist auch noch unklar. Vielleicht entsteht intermediär Körper XVIII, der dann analog



XVII XVIII

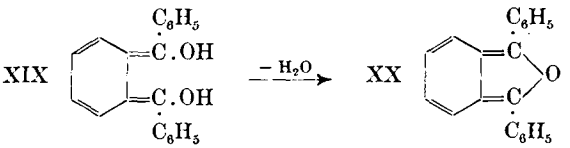
z. B. dem Anthrahydrochinon schon durch Luftsauerstoff in Dibenzoyl-dithienyl übergehen müßte. Für eine solche Deutung spricht, daß die gelbe Lösung des Körpers in Eisessig mit Zinkstaub zunächst eine tief blutrote Färbung annimmt, die beim Schütteln mit Luft verschwindet und dann wiederkehrt, ein Spiel, das man so oft wiederholen kann, bis völlige Reduktion zum entsprechenden sekundären

[1]) V. Meyer, B. **16**, 2971 (1883).

[2]) Die gelbe bis gelbrote Färbung des Körperz zeigt im Vergleich zum farblosen 4,4'-Dibenzoyl-diphenyl wieder die bathochrome Wirkung der konjugierten Doppelbindungen des Dithienylsystems.

Der beim Bromieren entstehende Dibromkörper muß *3,3'-Dibrom-5,5'-dibenzoyl-2,2'-dithienyl* sein, da erfahrungsgemäß neben die in α-Stellung sitzende Benzoylgruppe kein Brom eintritt und die der Dithienylbindung benachbarte 3,3'-Stellung besonders reaktionsfähig ist.

Alkohol eingetreten ist. Offenbar wird dabei das Dibenzoyl-dithienyl zum chinoiden Stoff XVIII[1]) reduziert, der durch Luft wieder zum Keton oxydiert wird. Analog verhalten sich — und das spricht für die Annahme — 2,5-Dibenzoyl-thiophen und 1,4-Dibenzoyl-benzol, während 1,3-Dibenzoylbenzol, das ein chinoides System nicht ausbilden kann, keine Färbung gibt. Beim 1,2-Dibenzoyl-benzol tritt bei der Reduktion grüngelbe Färbung mit blauer Fluoreszenz auf, und es krystallisieren beim Erkalten Krystalle vom Schmelzpunkt 126—128° aus, die sich durch den Mischschmelzpunkt als identisch mit dem bekannten *Diphenyl-benzofuran* erweisen. Das zeigt, daß auch 1,2-Dibenzoyl-benzol primär zu der dem Körper XVIII analogen chinoiden Verbindung XIX reduziert wird, die aber unter Wasseraustritt in XX übergeht.



Die Versuche beweisen, daß alle untersuchten Indophenine Abkömmlinge des 2,2'-Dithienyls bzw. eines noch unbekannten, auch dem Körper XVIII zugrunde liegenden Dithienyl-chinons sind, und so muß man auch dem Isatin-[thiophen]-indophenin die Schlenk-Hellersche Formel I zuerteilen. Die Bildung der Indophenine vollzieht sich also tatsächlich nach Schema B. Das zunächst Ungewöhnliche dieser Auffassung verschwindet, wenn man mit W. König[2]) annimmt, daß die als Zwischenprodukte auftretenden tertiären Alkohole infolge der benachbarten negativen Reste wie im Triphenylcarbinol stark gelockerte Hydroxylgruppen oder, bei Gegenwart von Schwefelsäure, wiederum analog den Salzen des Triphenylcarbinols, SO_4H-Ionen haben, die,

[1]) Dies muß, da es wie die Indophenine ein Derivat des Dithienyl-chinons ist, erheblich tiefer gefärbt sein. Die Lösung des bei der Reduktion des Dibenzoyl-dithienyls mit Natriumhydrosulfit entstehenden Natriumsalzes ist tiefblau.

[2]) Privatmitteilung.

die ersteren in der Wärme, die letzteren schon bei gewöhnlicher Temperatur, leicht abionisieren und zusammen mit dem α-H-Atom des Thiophenkerns, das sich, etwa wie in den Triphenylmethan-Farbstoffen das p-H-Atom, ebenfalls in einem besonders gelockerten Zustand befindet, die intramolekulare Wasserabspaltung ermöglichen.

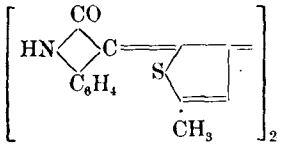
Bei -50^0 lösen sich ms-[2-Thienyl]-benzoin-methyläther und α-[2-Thienyl]-mandelsäureester in konz. Schwefelsäure mit tief gelber Farbe; diese Halochromie verschwindet beim Eingießen in Wasser. Indopheninbildung findet dabei nicht statt.

Unsere Versuche zeigen auch gewisse Gesetzmäßigkeiten bezüglich der Farbe der Indophenine. *Blau* sind nur die, die eine echte 1,2-Diketo-Gruppe haben, wobei es gleichgültig ist, ob diese Gruppe sich wie im Isatin in einem Ring, oder, wie beim Benzil, in offener Kette befindet. Die übrigen, z. B. die Indophenine der Phenyl-glyoxylsäure, ihres Esters, oder das Mesoxophenin, die also die Gruppierung —CO.COOH (oder R) haben, sind rot bis blauviolett gefärbt. Daß aber unter sonst gleichen Verhältnissen Ringbildung doch bathochrom wirkt, läßt sich besonders schön am blauen *Cumaran-2,3-dion-[thiophen]-indophenin* zeigen, das durch Aufspaltung mit Alkali eine *rote* Lösung gibt, in der das Salz des *o-Oxyphenyl-glyoxylsäure-[thiophen]-indophenins* enthalten sein muß.

Das bisher Gesagte gilt nur für die α-Indophenine. Die β-Indophenine, die sich von Thiophenen mit einer verbauten α-Stellung ableiten, sind den α-Indopheninen hinsichtlich ihrer Farbe, Verküpbarbeit, Löslichkeit aber so ähnlich[1]), daß sie auch ähnlich konstituiert sein müssen. Sie können nicht Derivate des 2,2′-Dithienyl-5,5′-chinons, wohl aber solche des 3,3′-Dithienyl-2,2′-chinons sein, und das aus 2-Methylthiophen und Isatin erhaltene Indophenin müßte z. B. der Formel XXI entsprechen[2]). An Stelle der

[1]) Steinkopf u. Hempel, a. a. O.

[2]) Formel IIb ist durch unsere Versuche überholt. Die von Heller, Ch. Z. **1933**, 74 für β-Indophenine vorgeschlagene steht im Widerspruch zu der festgestellten Zwischenbildung der tertiären Alkohole.

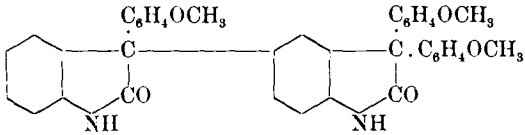
XXI 

fünf konjugierten Doppelbindungen der α-Indophenine besäße das System nur deren drei; das würde die schon beobachtete schwache hypsochrome Wirkung erklären. Wir haben zur Klärung der Frage *α-[2-Methyl-thienyl-5]-mandelsäure-äthylester* (VI; x = CH_3) dargestellt, daraus aber noch keine merklichen Farbstoffmengen erhalten können. Das *ms-[2-Methyl-thienyl-5]-benzoin* (VIII; x = CH_3) gibt einen sehr empfindlichen blauen Farbstoff, der aber noch nicht rein erhalten werden konnte. Schließlich gab grignardiertes 2,5-Dibromthiophen mit Benzil das *ms-[2-Brom-thienyl-5]-benzoin* (VIII; x = Br), das sich aber auch nur schwer zu einem Indophenin umsetzen läßt. Die Versuche werden fortgesetzt[1]).

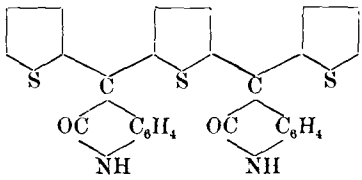
Die Mikroanalysen hat Herr Kollege M. Boëtius wieder in dankenswerter Weise durchgeführt.

---

[1]) Nach S. Inagaki, J. pharm. Soc. Japan **59**, 1 (1939); C. **1939**, I, 3889 entsteht bei der Kondensation von Isatin mit Anisol aus dem primär sich bildenden 3-(4′,4″-Dimethoxydiphenyl)-isatin und dem als Zwischenprodukt anzunehmenden 3-(4′-Methoxyphenyl)-dioxindol das Anisol-isatyl-dianisol-isatin



Dann sind offenbar die von Steinkopf u. Hempel, a. a. O. als Nebenprodukte bei den Indophenindarstellungen erhaltenen und als Körper vom Typus



Versuche.

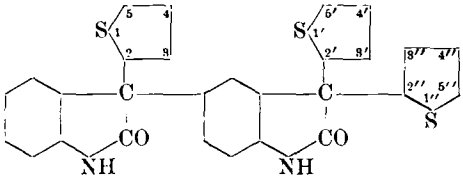
3-[2-Thienyl]-dioxindol (III).

Der beim Verdampfen des Äthers einer aus 53 g 2-Jodthiophen und 6 g Magnesium erhaltenen Grignardlösung verbleibende flüssige Rückstand wird in 100 ccm Benzol gelöst und die Lösung innerhalb 30 Minuten zu einer Suspension von 14,8 g Isatin in 500 ccm Benzol getropft. Man kocht noch 15 Minuten, gibt 500 ccm 10-proc. Natronlauge zu, destilliert das Benzol ab, filtriert, wäscht mit Wasser nach und säuert das Filtrat mit Eisessig an. Die hellbraune Fällung wird nach längerem Stehen im Eisschrank abgesaugt und aus Alkohol–Wasser 1:1 mit Tierkohle umkrystallisiert. 14,3 g fast farblose Prismen vom Schmelzp. 208—208,5° unter Blaufärbung.

19,71 mg Subst.: 45,13 mg CO_2, 7,17 mg H_2O. — 20,00 mg Subst.: 1,017 ccm N (18°, 758 mm).

$C_{12}H_9O_2NS$	Ber.	C 62,30	H 3,92	N 6,06
	Gef.	„ 62,45	„ 4,07	„ 5,91.

aufgefaßten Verbindungen analog zu formulieren als Derivate des *[2-Thienyl]-2-isatyl-di-[2-thienyl]-2-isatins*:



Es wären dann das Bis-[α-oxo-dihydro-β-indoliden]-tris-[2-thiotolen] als dessen 5,5′,5′-Trimethylderivat, der aus 3,4-Thioxen entstehende Körper als das 3,4,3′,4′,3″,4″-Hexamethylderivat und der analoge Körper aus 2,4-Thioxen als 3,5,3′,5′,3″,5″-Hexamethylderivat zu bezeichnen. Das Bis-[α-oxo-dihydro-β-indoliden]-tris-[thiophten] trägt an Stelle der 3 Thiophenreste die Reste des Thiophtens und ist als *[2-Thiophtenyl]-2-isatyl-di-[2-thiophtenyl]-2-isatin*, die analoge Verbindung aus 2,2′-Dithienyl, Steinkopf u. Roch, A. **482**, 255 (1930), als *[2,2′-Dithienyl-5]-2-isatyl-di-[2,2′-dithienyl-5]-2-isatin* zu bezeichnen.

Die Beobachtung Inagakis erklärt die längst bekannte Tatsache, daß man aus 5-Bromisatin reinere Indophenine als aus Isatin erhält, weil so die Reaktionsfähigkeit des 5-H-Atoms ausgeschaltet ist und die Bildung von Nebenprodukten weitgehend vermieden wird.

Kocht man Thienyl-dioxindol $^1/_2$ Stunde mit verdünnter Natronlauge, so erhält man nach Diazotieren mit β-Naphtol einen roten Azofarbstoff.

Benzoylierung. Zu 0,5 g in 2,5 g Pyridin 1 g Benzoylchlorid unter Kühlung. Nach 5 Stunden mit Wasser verdünnen, sich schmierig Abscheidendes mit verdünnter Salzsäure waschen und aus Alkohol krystallisieren. Das *1,3-Dibenzoyl-3-[2-thienyl]-dioxindol* bildet Nadeln vom Schmelzp. 159°.

27,05 mg Subst.: 0,715 ccm N (19,5°, 758,5 mm).

$C_{26}H_{17}O_4NS$ Ber. N 3,19 Gef. N 3,05.

Isatin-[thiophen]-indophenin.

1. Nach Steinkopf und Hempel[1]) dargestelltes und durch Umküpen vorgereinigtes Indophenin läßt sich aus Benzoesäureester (500 ccm auf 1 g) oder Pyridin (100 ccm auf 1 g) bei langsamem Abkühlen deutlich mikrokrystallin erhalten, aus dem Ester in Drusen, aus Pyridin in Nädelchen. Ausbeute 0,3 g. Bei 2-maligem Umkrystallisieren sind die Substanzen analysenrein.

23,44 mg Subst. (aus Ester): 58,08 mg CO_2, 7,39 mg H_2O. — 20,50 mg Subst. (aus Pyridin): 50,59 mg CO_2, 6,64 mg H_2O.

$C_{24}H_{14}O_2N_2S_2$ Ber. C 67,60 H 3,31
Gef. „ 67,58, 67,30 „ 3,53, 3,62.

2. Dasselbe Indophenin erhält man durch Erhitzen von 3,5 g mit 30 g wasserfreiem Chlorzink verriebenem Thienyl-dioxindol 15 Minuten im Ölbad auf 180°. Auskochen mit 1 Liter n-Salzsäure, säurefrei waschen und 4-mal aus Pyridin umkrystallisieren. Ausbeute 40 mg.

20,93 mg Subst.: 51,98 mg CO_2, 6,94 mg H_2O.

$C_{24}H_{14}O_2N_2S_2$ Ber. C 67,60 H 3,31 Gef. C 67,73 H 3,71.

1-Essigester-3-[2-thienyl]-5-brom-dioxindol (V).

4,6 g grignardiertes 2-Jodthiophen in 40 ccm Äther in 20 Minuten zu einer Suspension von 6,24 g gepulvertem 5-Bromisatin-1-essigester in 200 ccm Äther geben, absaugen, mit Äther waschen und mit 10-proc. Essigsäure zersetzen. Ausäthern, mit Sodalösung waschen, Äther trocknen und verdampfen. Verbleibenden roten Sirup aus Alkohol–Wasser 1:1 umlösen; schwach rotes Öl, das dann aus Tetrachlorkohlenstoff in Nadeln herauskommt, die nach 4-maligem Krystallisieren bei 122,5 bis 123,5° schmelzen. Ausbeute 5,9 g. Sie enthalten Krystall-Tetrachlorkohlenstoff, der schon an der Luft entweicht. Schmelzpunkt dann 124—125°.

[1]) a. a. O.

23,55 mg Subst.: 41,92 mg CO_2, 7,88 mg H_2O. — 27,17 mg Subst.: 0,850 ccm N (21°, 755 mm).

$C_{16}H_{14}O_4NBrS$	Ber.	C 48,47	H 3,56	N 3,54
	Gef.	„ 48,55	„ 3,74	„ 3,58.

Durch 10 Minuten langes Erwärmen einer Lösung von 3,7 g in 150 ccm Eisessig mit einer Mischung von 120 ccm konz. Schwefelsäure und 40 ccm Eisessig auf 55—60°, Eingießen in viel Wasser und 3-maliges Umkrystallisieren aus Pyridin erhält man 0,15 g des schon von Steinkopf und Hempel[1]) direkt dargestellten *5-Brom-1-essigester-isatin-[thiophen]-indophenins* als blaue Mikronadeln.

3,409 mg Subst.: 6,410 mg CO_2, 0,960 mg H_2O.

$C_{32}H_{24}O_6N_2Br_2S_2$ Ber. C 50,80 H 3,17 Gef. C 51,28 H 3,15.

1-Methyl-3-[2-thienyl]-dioxindol.

Aus 5,3 g grignardiertem und vom Äther befreiten 2-Jodthiophen in 20 ccm Benzol und 3 g 1-Methylisatin in 100 ccm Benzol analog dem 3-[2-Thienyl]-dioxindol. 2 g Rohprodukt, das aus Xylol 1,5 g derbe Krystalle vom Schmelzp. 127,5—129° (Blaufärbung) gibt. Liefert mit Eisessig-Schwefelsäure das entsprechende Indophenin.

25,80 mg Subst.: 60,05 mg CO_2, 10,33 mg H_2O.

$C_{13}H_{11}O_2NS$ Ber. C 63,63 H 4,52 Gef. C 63,48 H 4,48.

5-Brom-3-[2-thienyl]-dioxindol.

Aus 5,3 g 2-Jodthiophen und 2,3 g 5-Bromisatin, sonst wie oben, nur wird $1^1/_2$ Stunde gekocht. 2-maliges Umkrystallisieren des Rohproduktes aus 70-proc. Alkohol gibt Nadeln vom Schmelzp. 217,5° unter Aufschäumen und Violettfärbung. Eisessig-Schwefelsäure gibt das Indophenin.

23,57 mg Subst.: 40,35 mg CO_2, 5,62 mg H_2O.

$C_{12}H_8O_2NBrS$ Ber. C 46,44 H 2,60 Gef. C 46,49 H 2,67.

Mesoxalsäurediäthylester-[thiophen]-indophenin (Mesoxophenin).

Zu 10,6 g in 50 ccm Äther mit 1,2 g Magnesium grignardiertem 2-Jodthiophen läßt man 8,8 g Mesoxalsäureester in 50 ccm Äther tropfen. Nach beendeter Reaktion saugt man ab, zersetzt den Rückstand mit 5-proc. Essigsäure, nimmt in Äther auf, entsäuert mit Sodalösung, trocknet mit Natriumsulfat und verjagt den Äther. Der Rückstand wird 2-mal

[1]) a. a. O., S. 160.

i. Hochv. destilliert und Fraktion 146—151° (3 mm) aufgefangen. 1 g davon wird mit 10 ccm konz. Schwefelsäure 5 Minuten geschüttelt, in Eiswasser gegeben und der Farbstoff in 15 ccm Chloroform aufgenommen. 45 ccm Methylalkohol lassen aus der Lösung in 10-tägigem Stehen im Eisschrank 0,24 g rotviolette, glänzende Nädelchen vom Schmelzp. 157—158° ausfallen, der durch Umfällen auf 158—159° steigt. Mischschmelzpunkt mit Mesoxophenin ebenso.

Verseifung. 0,5 g Mesoxophenin (dargestellt nach Schlenk und Blum, a. a. O.) in 20 ccm heißem Dioxan mit 2 g Kali in 20 ccm Methylalkohol $^1/_2$ Stunde unter Rückfluß kochen, am nächsten Tage absaugen, das gelbrötliche Pulver in Wasser lösen, ansäuern, ausäthern. Ätherverdampfrückstand in absolutem Alkohol lösen und 10 ccm 10-proc. alkoholisches Kali zugeben. Es fällt das gelbrote Kaliumsalz des *Glyoxylsäure-[thiophen]-indophenins* (XII) aus, das mit Alkohol und Äther gewaschen wird.

0,0594 g Subst.: 0,0295 g K_2SO_4.

$C_{12}H_6O_4S_2K_2$ Ber. K 21,94 Gef. K 22,28.

2,2'-Dithienyl-5,5'-bis-[malonsäurediäthylester] (XIII).

Aus 10 g Mesoxophenin in 500 ccm Eisessig analog der Darstellung von IX. Aus Benzin (Siedep. 120—130°) schwach gelbliche Blättchen vom Schmelzp. 111,5—112,5°. Die farblose Dioxanlösung wird bei Zugabe von etwas Kali beim Schütteln mit Luft rot.

23,45 mg Subst.: 47,21 mg CO_2, 11,67 mg H_2O.

$C_{22}H_{26}O_8S_2$ Ber. C 54,73 H 5,43 Gef. C 54,91 H 5,57.

2,2'-Dithienyl-5,5'-bis-[essigsäure] (XIV).

10 g Dithienyl-bis-malonsäureester werden in 500 ccm absolutem Alkohol unter Luftausschluß mit 20 g Kali in 125 ccm Alkohol 30 Minuten gekocht; am nächsten Morgen wird der Niederschlag abfiltriert, in 100 ccm Wasser gelöst und unter Kühlung mit 50-proc. Essigsäure angesäuert. Weißgelbe, feinkrystalline Fällung, die nach Stehen über Nacht im Eisschrank abgesaugt und getrocknet wird. 5,6 g. Färbt sich von 210° an dunkel und schmilzt bei 217°. Beim Umkrystallisieren aus Wasser glänzende Blättchen; dabei

entsteht etwas Harz. Der Analyse nach findet auch schon geringe Decarboxylierung statt.

3,240 mg Subst.: 6,160 mg CO_2, 1,045 mg H_2O.

$C_{12}H_{10}O_4S_2$ Ber. C 51,03 H 3,57 Gef. C 51,85 H 3,61.

Der Methylester entsteht aus der ätherischen Lösung der Säure mit ätherischer Diazomethanlösung. Nach dem Verdampfen des Äthers bald erstarrendes, rotbraunes Öl. Mehrfach aus Benzin (Siedep. 70—80°) mit Tierkohle krystallisieren; gelbe Drusen vom Schmelzp. 75,5—77°.

20,74 mg Subst.: 41,39 mg CO_2, 8,88 mg H_2O.

$C_{14}H_{14}O_4S_2$ Ber. C 54,15 H 4,55 Gef. C 54,43 H 4,79.

Decarboxylierung der Säure: 3,5 g der rohen Säure mit 7 g Naturkupfer „C" verreiben und im Säbelkolben im Wasservakuum sehr vorsichtig erhitzen, bis die Kohlendioxydabspaltung beendet ist. Flüchtiges mit fächelnder Flamme in den Säbelansatz übertreiben und nach Zugabe von etwas verdünnter Kalilauge mit Wasserdampf destillieren. 0,43 g Krystalle, die nach mehrfachem Umkrystallisieren aus Alkohol-Wasser 3:2 für sich und in Mischung mit *5,5'-Dimethyl-2,2'-dithienyl*[1]) bei 65,5—66,5° schmelzen.

α-[2-Thienyl]-mandelsäure-äthylester (VI) (X = H).

Aus der Grignardlösung von 5,3 g 2-Jodthiophen und 4,4 g Phenylglyoxylsäure-äthylester in je 20 ccm Äther. Mit verdünnter Salzsäure zersetzen, mit Sodalösung waschen, trocknen, Äther verjagen. Das braune Öl gibt bei 2-maliger Destillation eine bei 136° (0,3 mm) siedende Fraktion, die beim Erkalten erstarrt und bei 59,5—60,5° schmilzt. Ausbeute 2 g.

24,20 mg Subst.: 57,03 mg CO_2, 12,11 mg H_2O.

$C_{14}H_{14}O_3S$ Ber. C 64,08 H 5,38 Gef. C 64,27 H 5,60.

Phenyglyoxylsäure-äthylester-[thiophen]-indophenin (XV).

1. 0,8 g Thienyl-mandelsäureester werden geschmolzen, auf Zimmertemperatur unterkühlt und mit 20 ccm konz. Schwefelsäure 5 Minuten geschüttelt. Man gießt in Eiswasser, nimmt den Farbstoff in 10 ccm Chloroform auf und fügt 20 ccm Methylalkohol zu. Nach 8 Tagen im Eisschrank sind 10 mg rotvioletter, glänzender Nädelchen gefallen, die beim Reiben grünen Oberflächenglanz annehmen. Den gleichen Körper erhält man durch Schmelzen des Thienyl-mandelsäureesters mit Chlorzink. Schmelzp. 208°.

[1]) Steinkopf u. Roch, a. a. O.

2. 4,2 g Phenylglyoxylsäure-äthylester und 3 g Thiophen werden in 320 ccm Petroläther bei 0° mit 55 ccm eisgekühlter Schwefelsäure 5 Minuten unter weiterer Kühlung geschüttelt. Petroläther abgießen, Säureschicht auf Eis geben. Die zähe, rote Masse gibt in 40 ccm Chloroform mit 130 ccm Methylalkohol wie bei 1. 0,9 g des Indophenins, das nach weiterem Krystallisieren aus Xylol Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt 208° zeigt. Wenig löslich in Eisessig, Aceton und Alkohol, leicht in Chloroform, Pyridin und heißem Dioxan.

24,53 mg Subst.: 61,71 mg CO_2, 10,66 mg H_2O.

$C_{28}H_{24}O_4S_2$ Ber. C 68,81 H 4,95 Gef. C 68,61 H 4,86.

Die freie Säure (XVII): 5-stündiges Kochen von 2 g Ester mit 200 ccm 2,5-proc. alkoholischem Kali, verdünnen mit 400 ccm Wasser, filtrieren, ansäuern. Roten Niederschlag mit Wasser waschen. 1,7 g Rohprodukt vom Schmelzp. 208—210° unter Zers. Ähnelt im Aussehen dem Ester. Analysiert wurde das *Kaliumsalz*, das aus 2,5-proc. Kalilauge über Nacht in roten Nädelchen ausfällt.

19,76 mg Subst.: 6,58 mg K_2SO_4.

$C_{24}H_{14}O_4S_2K_2$ Ber. K 15,40 Gef. K 15,00.

2,2'-Dithienyl-5,5'-bis-[α-phenylessigsäure-äthylester].

1,5 g Phenylglyoxylsäure-diäthylester-[thiophen]-indophenin werden in 75 ccm siedendem Eisessig mit Zinkstaub entfärbt; man filtriert in 300 ccm Wasser, äthert aus und krystallisiert das nach dem Trocknen und Verdampfen bleibende, schmierig fest werdende Öl mehrfach aus Benzin (Siedep. 90—100°) um. Schwach gelbe Blättchen vom Schmelzp. 95—96,5°.

22,50 mg Subst.: 56,64 mg CO_2, 10,70 mg H_2O.

$C_{28}H_{26}O_4S_2$ Ber. C 68,52 H 5,34 Gef. C 68,47 H 5,31.

Die freie Säure (XVI). 1,7 g rohes Phenylglyoxylsäure-[thiophen]-indophenin in 300 ccm Wasser, 30 ccm konz. Ammoniak und 2 g Chlorammonium lösen und mit Zinkstaub entfärben. Noch heiß in 600 ccm Wasser + 50 ccm konz. Salzsäure hineinfiltrieren, nach Abkühlen auf 0° nach 2 Stunden die Säure abfiltrieren und i. V. trocknen. Gelbliches Pulver vom Schmelzp. 70—85° (Zers.).

Decarboxylierung. 3,8 g Säure im Ölbad auf 250° bis zum Aufhören der Kohlendioxydentwicklung erhitzen. Nach dem Erkalten mit Äther ausziehen, filtrieren, mit verdünnter Kalilauge durchschütteln, mit Chlorcalcium trocknen, Äther verjagen. Bald erstarrendes, dunkelbraunes Öl. Mit 50 ccm Alkohol auskochen, Lösung mit Tierkohle behandeln, filtrieren und in Eis stellen. 0,85 g Krystalle; nach mehrfachem

Umkrystallisieren schwach gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt des *5,5'-Dibenzyl-2,2'-dithienyls* 96,5—97,5°.

Dies entsteht auch direkt aus Phenylglyoxylsäure-[thiophen]-indophenin bei vorsichtigem Erhitzen im Wasservakuum bis zur Beendigung der Gasentwicklung, Übertreiben des Flüchtigen und Umkrystallisieren.

5,5'-Dibenzoyl-2,2'-dithienyl.

7 g Titantetrachlorid werden allmählich unter Wasserkühlung und Schütteln zu einer Lösung von 3,4 g 2,2'-Dithienyl und 9 g Benzoylchlorid in 15 ccm thiophenfreiem Benzol gegeben. Man läßt die dunkelviolette Lösung über Nacht stehen, gibt die dann fast feste olivgrüne Masse in verdünnte Salzsäure und bläst das Benzol mit Dampf ab. Der Rückstand wird abfiltriert, getrocknet, mehrmals mit Äther ausgezogen, das darin Unlösliche mit etwa 600 ccm Dioxan ausgekocht und filtriert. Beim Erkalten scheiden sich 1,2 g orangefarbener Krystalle vom Schmelzp. 250 bis 252° aus.

Denselben Körper erhält man, wenn man eine Lösung von Phenylglyoxylsäure-[thiophen]-indophenin in 2 n-Ammoniak bis zum Verschwinden der roten Farbe stehen läßt, ausgeschiedenen gelben Niederschlag absaugt, mit Ammoniak wäscht und aus Dioxan krystallisiert. Schmelzpunkt und Mischschmelzp. 250—252°.

22,04 mg Subst. von 1: 57,14 mg CO_2, 7,71 mg H_2O. — 2,419 mg Subst. von 2: 6,270 mg CO_2, 0,870 mg H_2O.

$C_{22}H_{14}O_2S_2$	Ber.	C 70,54	H 3,77
	Gef.	„ 70,71, 70,69	„ 3,91, 4,03.

Konz. Schwefelsäure löst mit intensiv grüngelber Fluorescenz. Heißer Eisessig und Amylalkohol lösen sehr schwer, Pyridin schwer, Benzoesäureester leichter, Chloroform etwas, Dioxan am besten. Diese Lösungen fluorescieren nur unter der Analysenquarzlampe, die in Pyridin gelb, die übrigen blau. Die Eisessiglösung gibt mit Zinkstaub blutrote Färbung; die Farbe verschwindet beim Schütteln mit Luft und kehrt dann wieder.

Bromierung. Dibenzoyl-dithienyl gibt beim Übergießen mit Brom und langsamen Verdunsten des Überschusses roten Körper, der beim Erwärmen auf dem Wasserbade gelb wird. Nicht löslich in Äther, löslich in Benzol, Pyridin, Dioxan, kaum in Eisessig und sehr schwer in Ligroin (Siedep. 100—110°), aus dem er in schwach rötlichgelben, pleochroitischen Krystallen herauskommt. Schmelzpunkt des *3,3'-Dibrom-5,5'-dibenzoyl-2,2'-dithienyls* 195—197°.

3,301 mg Subst.: 6,035 mg CO_2, 0,700 mg H_2O. — 3,718 mg Subst.: 2,633 mg AgBr.

$C_{22}H_{12}O_2Br_2S_2$	Ber.	C 49,62	H 2,26	Br 30,08
	Gef.	„ 49,86	„ 2,37	„ 30,14.

Gegen Zinkstaub und Eisessig verhält sich der Körper wie das nicht bromierte Produkt, nur daß das Rot mehr violett ist. In wäßrigem Alkohol mit Natriumhydrosulfit entsteht eine blaue Lösung, die durch Luft langsam entfärbt wird.

Methyläther des ms-[2-Thienyl]-desoxybenzoins (VIII).

Die Grignardlösung aus 10,5 g 2-Jodthiophen in 75 ccm Äther gibt man unter Eiskühlung allmählich zu der Lösung von 10,5 g Benzil in 100 ccm Äther. Es fällt gelbweißer Niederschlag. Nach $^1/_4$-stündigem Kochen saugt man ab, wäscht mit Äther und gibt die Magnesiumverbindung sofort unter Eiskühlung portionsweise in 100 ccm gesättigte Chlorammoniumlösung, die mit 160 ccm ätherischer Diazomethanlösung (aus 16 g Nitrosomethylharnstoff) überschichtet ist. Nach Beendigung der Stickstoffentwicklung ätherische Schicht auf 40 ccm einengen, mit Chlorcalcium trocknen, dann völlig eindampfen. Mehrfaches Umkrystallisieren aus Benzin (Siedep. 70—80°) gibt Krystalle vom Schmelzp. 71 bis 72°.

0,1327 g Subst.: 0,3593 g CO_2, 0,0593 g H_2O.

$C_{19}H_{16}O_2S$ Ber. C 73,98 H 5,23 Gef. C 73,85 H 5,00.

Benzil-[thiophen]-indophenin (X).

80 g [2-Thienyl]-benzoin-methyläther in 500 ccm Eisessig und 500 ccm konz. Schwefelsäure in 900 ccm Eisessig werden bei 45—50° zusammengegeben, 20 Minuten auf dieser Temperatur gehalten, in 10 Liter Eiswasser gegossen, vom Niederschlag wird abgesaugt, dieser nochmals mit 10 Liter Wasser digeriert und säurefrei gewaschen. Nach 2-maligem Umkrystallisieren aus Nitrobenzol Schmelzp. 223°.

Stäbchenförmige goldgrünglänzende Nädelchen, die beim Zerreiben blau werden, leicht löslich in Aceton, Chloroform, Dioxan, schwer in Benzin und Alkohol mit schwach rotstichig blauer Farbe. Krystallisiert auch aus Pyridin und Benzoesäureester. Seine Empfindlichkeit in Lösung zeigt sich daran, daß seine verdünnten Lösungen schon nach mehrtägigem Stehen gelb geworden sind.

20,89 mg Subst.: 59,73 mg CO_2, 8,19 mg H_2O. — 0,1994 g Subst. in 24,19 g Chloroform (K = 36,6): Δ = 0,061°.

$C_{36}H_{24}O_2S_2$	Ber.	C 78,21	H 4,38	M 552
	Gef.	„ 77,98	„ 4,39	„ 495.

ms-Bis-[2-thienyl]-desoxybenzoin.

Eiskalte Lösung von 4 g Benzil und 1,6 g Tiophen in 100 ccm Chloroform 5 Minuten mit 100 ccm eiskalter konz. Schwefelsäure schütteln. Auf Eis. Blaue Chloroformschicht mit verdünntem Natron waschen, trocknen, Chloroform abdunsten. Blauen Sirup in 250 ccm Benzin (Siedep. 120—130°) lösen und an einer Al_2O_3-Säule chromatographieren. Schon beim Durchsaugen und während des Entwickelns mit Benzin scheiden sich am Ende der Säule farblose Krystalle ab, die nach zweimaligem Umkrystallisieren aus hochsiedendem Benzin bei 103,5—104° schmelzen.

3,677 mg Subst.: 9,890 mg CO_2, 1,460 mg H_2O.

$C_{22}H_{16}OS_2$ Ber. C 73,28 H 4,48 Gef. C 73,36 H 4,44.

5,5'-Bis-[(phenyl-benzoyl)-methyl]-2,2'-dithienyl (IX).

Die blaue Lösung von 5 g Benzil-[tiophen]-indophenin in 500 ccm siedendem Eisessig wird mit Zinkstaub entfärbt und sofort in 1500 ccm Wasser vom Zink abgesaugt. Die flockige Fällung wird mit Wasser gewaschen, i.V. getrocknet und dreimal aus Toluol–Benzin (Siedep. 120—130°) 2:1 umkrystallisiert. Schmelzp. 219,5—220,5° unter Blaufärbung.

24,12 mg Subst.: 69,09 mg CO_2, 10,31 mg H_2O.

$C_{36}H_{26}O_2S_2$ Ber. C 77,93 H 4,72 Gef. C 78,12 H 4,75.

Gibt beim Schütteln der alkoholisch-alkalischen Lösung mit Luft oder beim Erhitzen in hochsiedenden Lösungsmitteln den Farbstoff zurück.

Spaltung. 2 g werden mit einer Lösung von 10 g Natrium in 100 ccm Alkohol 5 Stunden in Wasserstoff-Atmosphäre gekocht. In 400 ccm Wasser hineinfiltrieren, Ausfallendes (1,15 g) zweimal aus Alkohol krystallisieren. Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt mit *5,5'-Dibenzyl-2,2'-dithienyl* (vgl. unten) 96,5—97,5°.

0,1327 g Subst.: 0,3710 g CO_2, 0,0622 g H_2O.

$C_{22}H_{18}S_2$ Ber. C 76,24 H 5,24 Gef. C 76,25 H 5,24.

Aus dem ersten Filtrat konnten durch Ausäthern 0,7 g Benzoesäure isoliert werden.

2-Benzyl- und 2,5-Dibenzylthiophen.

Zu einer fast siedenden Mischung von 30 g Thiophen und 30 g Benzylalkohol werden 30 g gepulvertes, wasserfreies Chlorzink nach und nach in dem Maße gegeben, als Lösung eintritt. Anfangs bei Zugabe lebhaftes Aufsieden. Die letzten Anteile lösen sich nicht mehr. Man hält dann in schwachem Sieden und nimmt, wenn dies nach etwa

$^1/_2$ Stunde als Beginn der einsetzenden Reaktion lebhafter wird, die Flamme fort und bändigt die Reaktion evtl. durch Kühlen. Die Flüssigkeit trennt sich in zwei Schichten. Man erhitzt weitere $1\,^1/_2$ Stunden und treibt dann Flüchtiges mit Wasserdampf über. Ausbeute aus 100 g Thiophen (in 3 Ansätzen) 108 g. Dies gibt nach Isolierung und Trocknung mit Chlorcalcium 42 g Thiophen vom Siedep. 81—85° und 51 g bei 257—262° siedendes *2-Benzyl-thiophen*[1]).

29,37 mg Subst.: 81,92 mg CO_2, 14,25 mg H_2O.

$C_{11}H_{10}S$ Ber. C 75,87 H 5,73 Gef. C 76,07 H 5,43.

Höher Siedendes wurde mit dem mit Wasserdampf nicht Flüchtigen vereinigt. Nach einem Vorlauf (8 g) erhält man daraus 23 g bei 200—245° (16 mm) Siedendes, das bei 2-maligem Rektifizieren 15,5 g bei 218—225° (Hauptanteil 220—222°) und 12 mm siedendes *2,5-Dibenzyl-thiophen* gibt.

36,87 mg Subst.: 110,22 mg CO_2, 20,17 mg H_2O. — 92,95 mg Subst.: 82,29 mg $BaSO_4$.

$C_{18}H_{16}S$	Ber.	C 81,82	H 6,06	S 12,12
	Gef.	„ 81,53	„ 6,12	„ 12,16.

5-Jod-2-benzyl-thiophen.

5 g gepulvertes 5-Chlormercuri-2-benzyl-thiophen[2]) mit 3,1 g Jod und 10 g Jodkalium in 50 ccm Wasser bei 50° bis zum Verschwinden der Jodfarbe schütteln. Beim Erkalten erstarrendes Öl aus Benzin (Siedep. 50—60°) mit Eis-Kochsalz ausfrieren. 2,8 g derbe Krystalle vom Schmelzp. 55—57°.

0,1248 g Subst.: 0,0971 g AgJ.

$C_{11}H_9JS$ Ber. J 42,30 Gef. J 42,06.

5,5'-Dibenzyl-2,2'-dithienyl.

1 g Jod-benzylthiophen und 1 g Naturkupfer „C" in Stickstoff bis zur lebhaften Reaktion auf 185—190°, dann noch 30 Minuten auf 190—210° erhitzen, erkaltete Schmelze mit Äther ausziehen, beim Verdampfen desselben verbleibendes, bald erstarrendes Öl zweimal aus Alkohol mit Tierkohle umkrystallisieren. 80 mg = 14 Proc. d. Th. vom Schmelzp. 96,5—97,5°.

25,24 mg Subst.: 70,63 mg CO_2, 12,09 mg H_2O.

$C_{22}H_{18}S_2$ Ber. C 76,24 H 5,24 Gef. C 76,32 H 5,36.

---

[1]) Vgl. Peter, B. **17**, 1346 (1884).

[2]) Steinkopf, A. **424**, 54 (1921).

ms-[2-Thienyl]-acetoin.

Die Grignardlösung aus 21 g 2-Jodthiophen gibt man allmählich zu 9 g Diacetyl in 100 ccm Äther. Nach dem Erkalten hellgelbe Fällung absaugen, waschen mit Äther, in 250 ccm 10-proc. Essigsäure eintragen, Öl in Äther mit Wasser und Sodalösung waschen, trocknen und Äther verjagen. Rückstand 2-mal i. Hv. destillieren. Siedep. 82° (1 mm). Schwach gelbes Öl, das sich in konz. Schwefelsäure mit tiefblauer Farbe löst. Wasser fällt daraus rotviolette, in Chloroform sich rot lösende Flocken.

23,77 mg Subst.: 48,86 mg CO_2, 12,62 mg H_2O.

$C_8H_{10}O_2S$ Ber. C 56,43 H 5,92 Gef. C 56,06 H 5,94.

Cumaran-2,3-dion-[thiophen]-indophenin.

Zu 15 g Cumaran-2,3-dion und 8,4 g Thiophen in 200 ccm warmem Eisessig Mischung von 50 ccm konz. Schwefelsäure und 50 ccm Eisessig geben, $^1/_2$ Stunde bei 55° halten, in 1500 ccm Eiswasser gießen, Ausfallendes nach dem Trocknen 3-mal mit je 150 ccm Aceton auskochen und den schwarzblauen Rest (0,2 g) aus 50 ccm wasserfreiem Pyridin krystallisieren. 90 mg grüngoldene Mikrokrystalle, die bei 300° nicht schmelzen und darüber ein rotes Sublimat geben.

3,982 mg Subst.: 9,795 mg CO_2, 1,055 mg H_2O.

$C_{24}H_{12}O_4S_2$ Ber. C 67,26 H 2,82 Gef. C 67,09 H 2,97.

ms-[2-Methylthienyl-5]-benzoin (VIII, x = CH_3).

Aus 9,8 g grignardiertem 5-Jod-2-thiotolen und 9,2 g Benzil in je 100 ccm Äther wie bei der Darstellung von VI. Rohprodukt ist ein brauner Sirup, der beim Reiben erstarrt. 2-mal aus Benzin (Siedep. 80—90°) mit Tierkohle umkrystallisieren. 5,7 g derbe Krystalle vom Schmelzp. 78—79°.

30,29 mg Subst.: 82,21 mg CO_2, 14,60 mg H_2O.

$C_{19}H_{16}O_2S$ Ber. C 73,98 H 5,23 Gef. C 74,02 H 5,39.

In Eisessig-Schwefelsäure mit blauer Farbe löslich, die schnell schmutzig rotbraun wird. Kurzes Erhitzen mit Benzoesäure auf 180° und Ausziehen mit Methylalkohol gibt blaues Pulver.

ms-[2-Bromthienyl-5]-benzoin (VIII, x = Br).

Aus 12 g frisch destilliertem, in 75 ccm Äther mit aktiviertem Magnesium[1]) grignardiertem 2,5-Dibrom-thiophen und 10,5 g Benzil in 200 ccm Äther wie bei der Darstellung von VI. Das bald erstarrende Rohprodukt wird mehrfach aus Benzin (Siedep. 80—90°) umkrystallisiert. Schmelzp. 99,5—100,5° (Violettfärbung).

[1]) v. Baeyer, B. **38**, 2759 (1905).

0,1340 g Subst.: 0,2840 g CO_2, 0,0432 g H_2O. — 0,1304 g Subst.: 0,0657 g AgBr.

$C_{18}H_{13}O_2BrS$	Ber.	C 57,89	H 3,51	Br 21,42
	Gef.	„ 57,80	„ 3,61	„ 21,44.

Kalte konz. Schwefelsäure löst nur mit gelber Halochromieerscheinung, die beim Gießen in Wasser verschwindet. Beim Erwärmen der Schwefelsäurelösung geht die Farbe über Grün in Blau über; Wasser fällt aber nur braune Flocken.

2-Jod-3-thiotolen-5-carbonsäure.

5 g 2,5-Dijod-3-thiotolen[1]) und 5 g Bromäthyl mit 1,47 g Magnesium in 50 ccm Äther grignardieren. Nach Verdünnen mit 200 ccm Äther Kohlendioxyd unter Eiskühlung einleiten, mit Salzsäure und Eis zersetzen, Ätherschicht abtrennen und Äther verdampfen, aus dem Rückstand Säure mit verdünntem Natron herauslösen und mit Salzsäure ausfällen. 5-mal aus Benzin (Siedep. 120—130°) umkrystallisieren. Nädelchen vom Schmelzp. 172—173°.

20,54 mg Subst.: 20,27 mg CO_2, 3,68 mg H_2O.

$C_5H_3O_2JS$	Ber.	C 26,87	H 1,87	Gef.	C 26,91	H 2,00.

Studien in der Thiophenreihe. L.

Über Derivate des 3,4-Dibromthiophen-2,5-dialdehyds und über makrocyclische Verbindungen;

von *Wilhelm Steinkopf, Reinhard Leitsmann, A. Herbert Müller* und *Helmut Wilhelm.*

(Eingelaufen am 1. September 1939.)

Es ist in früheren Arbeiten mehrfach auf den bathochromen Einfluß hingewiesen worden, den die konjugierten Doppelbindungen des Thiophens im Gegensatz zu denen des Benzols ausüben[2]). Wir haben zunächst versucht, weitere Beispiele für diese Tatsache durch Vergleich verschiedener

[1]) Steinkopf u. Hanske, A. **532**, 242 (1937). — Die obige Säure ist in der Mitteilung vergessen worden.

[2]) Steinkopf, v. Petersdorff u. Gording, A. **527**, 274 (1937); Steinkopf u. Eger, A. **533**, 272 (1938).

Derivate des 3,4-Dibromthiophen-2,5-dialdehyds mit solchen des Iso- und Terephtalaldehyds zu erbringen. Der nichtbromierte Thiophendialdehyd ist nicht bekannt; wir haben aber schon früher gezeigt, daß die Bromatome kaum einen Einfluß auf die Farbe haben. Es wurden durch Umsatz mit Anilin die *Di-anile*, mit o-Aminophenol die *Di-[o-oxyanile]* und mit Chinaldin das *3,4-Dibrom-2,5-bis-[β-chinolyl-(2)-äthylen]-thiophen* I bzw. die analogen Verbindungen, das *p-* und *m-Bis-[β-chinolyl-(2)-äthylen]-benzol* dargestellt; die

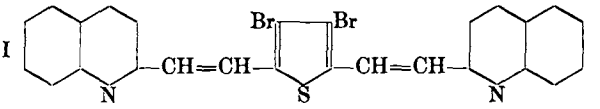


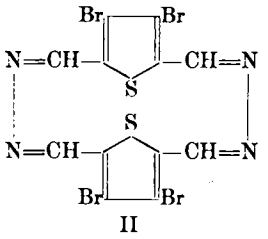
Tabelle zeigt auch hier deutlich den bathochromen Effekt der Thiophendoppelbindungen.

	3,4-Dibromthiophen-2,5-dialdehyd	Terephtalaldehyd	Isophtalaldehyd
Di-anil.	hellgelb	elfenbeinfarben	—
Di-[o-oxyanil]. . . .	orange	gelb	—
Chinaldinderivat . .	bräunlich-gelb	hellgrünlich-gelb	fast farblos
Dessen Hydrochlorid	rot	orange	gelb

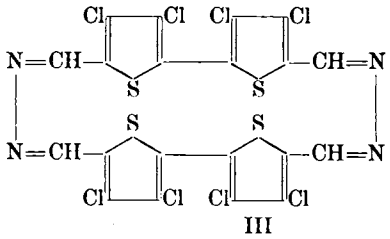
Auch die *3,4-Dibromthiophen-2,5-diacrylsäure*, die aus dem Dibromthiophen-dialdehyd nach Perkin direkt entsteht, während Terephtalaldehyd zunächst nur einseitig unter Bildung der p-Formylzimtsäure reagiert[1]), ist im Gegensatz zur farblosen p-Phenylen-diacrylsäure hellgelb gefärbt.

Wir haben dann die Arbeit von Steinkopf und Eger[2]) weiter verfolgt. Dort hatten wir aus dem Dibromthiophendialdehyd mit Hydrazin das tief carminrote Diazin II (und die analogen Derivate des Tere- und Isophtalaldehyds) erhalten, dessen Konstitution daraus hervorging, daß es auch aus dem Dihydrazon des Aldehyds mit diesem selbst entstand. Wir wollten nun prüfen, wie weit sich ein solcher Ring vergrößern ließe, und deshalb zunächst aus dem 5,5'-Dimethyl-2,2'-dithienyl die analoge Verbindung III (Brom statt

[1]) Löw, A. **231**, 375 (1885). [2]) a. a. O.



II

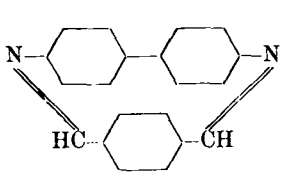


III

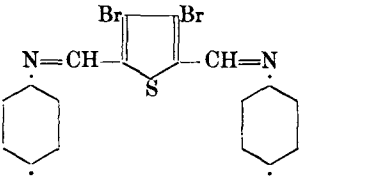
Chlor) aufbauen. Dies scheiterte daran, daß sich das Dimethyl-dithienyl wohl zum *3,4,3',4'-Tetrabrom-5,5'-dimethyl-2,2'-dithienyl* bromieren ließ, daß dieses aber mit überschüssigem Brom auch in der Wärme und im Quecksilberlicht nur noch 2 Bromatome unter Bildung von *3,4,3',4'-Tetrabrom-5,5'-di-[brommethyl]-2,2'-dithienyl* aufnahm, so daß sich der erforderliche Dialdehyd des Dithienyls nicht erhalten ließ. Seltsamerweise reagierte hier Chlor wesentlich intensiver, und das in Eisessig leicht erhältliche *3,4,3',4'-Tetrachlor-5,5'-dimethyl-2,2'-dithienyl* ging im Licht in Tetrachlorkohlenstoff recht glatt in *3,4,3',4'-Tetrachlor-5,5'-di-[dichlormethyl]-2,2'-dithienyl* über, aus dem sich der *3,4,3',4'-Tetrachlor-2,2'-dithienyl-5,5'-dialdehyd* erhalten ließ. Er bildet goldgelbe Nadeln, sein Chinaldinderivat ist satt orange, ein Zeichen des starken chromophoren Effekts des Dithienylkerns. Hydrazin gab damit einen Körper, der in seinen Eigenschaften, auch in der — noch tiefern — roten Farbe II so ähnelt, daß man ihm die Formel III zuerteilen muß.

Um zu anderen und noch größeren Ringen zu kommen, wollten wir aliphatische und aromatische Diamine mit den 3 Dialdehyden zur Reaktion bringen. Dies haben beim Iso- und Terephtalaldehyd schon R. Adams, J. E. Bullock und W. C. Wilson[1]), und zwar mit Benzidin und Dianisidin getan. Sie haben die den Formeln II und III analogen dimolekularen Formeln zwar in Betracht gezogen, sie aber zugunsten der monomolekularen Form IV für den z. B. aus Terephtalaldehyd und Benzidin entstehenden Körper verworfen, und zwar aus folgenden Gründen: Weil Benzidin bzw. Dianisidin mit Phtalsäure, Schwefelkohlenstoff und anderen unter Bildung

[1]) Am. Soc. **45**, 521 (1923).



IV



V

analoger Körper reagieren, deren Molekulargewichte eindeutig bestimmt werden konnten[1]). Weil die Verbindungen, die sie erhielten, die wegen ihrer Unlöslichkeit nicht gereinigt werden konnten, sofort in analysenreinem Zustand anfielen. Bei doppeltmolekularen Körpern wäre dies unwahrscheinlich, da dann die Reaktion auch in anderer Richtung unter Bildung ebenfalls unlöslicher Verbindungen von anderer Zusammensetzung hätte verlaufen müssen. Und schließlich, weil die beiden Dialdehyde sich mit anderen Diaminen, wie m- und p-Phenylendiamin, in keinem Falle zu homogenen Produkten kondensieren ließen.

Dazu ist zu sagen: Die Derivate, die man mit Phtalsäure, Schwefelkohlenstoff und anderen erhält, sind krystalline Körper von bestimmtem Schmelzpunkt, die echte Lösungen bilden. Die Kondensationsprodukte der Dialdehyde mit Benzidin und anderen Diaminen sind aber amorphe, unschmelzbare Körper. Wir fanden einige, die löslich sind, doch sind dies kolloide Lösungen, und z. B. die in Campher gibt keine Schmelzpunktsdepression.

Was die angebliche Analysenreinheit anbetrifft, so weichen bei den amerikanischen Autoren die C-Werte beim Terephtalaldehyd–Dianisidinprodukt immerhin um 0,67 Proc. und beim Isophtalaldehyd–Benzidinprodukt um 0,45 Proc. von der Theorie ab. Als wir das Terephtalaldehyd–Benzidinprodukt nach der amerikanischen Vorschrift darstellten, erhielten wir aber C-Werte, die sich um 1,54 Proc. von der Theorie unterschieden.

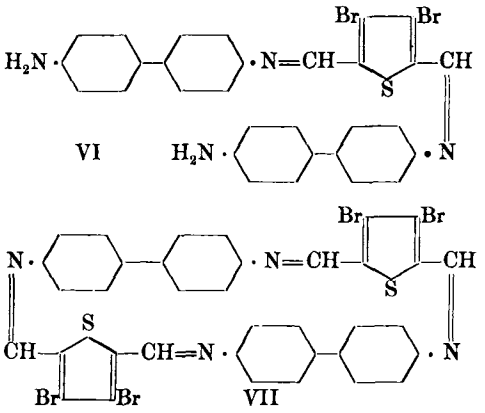
Schließlich haben wir die Dialdehyde mit den verschiedensten Diaminen zu analogen Körpern kondensieren können, die nicht uneinheitlicher waren als die mit Benzidin

[1]) F. Kaufler u. H. Borel, B. **40**, 3253 (1907).

erhaltenen. Aus alledem ziehen wir den Schluß, daß in den Substanzen Ringe von mindestens der dimolekularen Form vorliegen.

Wir haben dies zu beweisen versucht zunächst durch Molekulargewichtsbestimmung, die aber meist wegen der völligen Unlöslichkeit ausschied oder in den wenigen Fällen löslicher Substanzen, weil diese Lösungen kolloid waren. Auch dies deutet übrigens auf ein hohes Molekulargewicht hin. Wir haben dann das *3,4-Dibromthiophen-2,5-dialdehyd-di-[p-acetamino-anil]* V bzw. das analoge *Terephtalaldehyd-di-[p-acetamino-anil]* aus den betreffenden Dialdehyden und Acetyl-p-phenylendiamin dargestellt. Diese wollten wir zu den Di-p-aminoanilen verseifen, um diese dann mit einem weiteren Mol Aldehyd zum Ringe zu schließen. Doch setzte die Hydrolyse zuerst an der N=CH-Bindung unter Rückbildung der Aldehyde ein.

Bei der Kondensation des Dibromthiophen-dialdehyds mit Benzidin ist es aber gelungen, neben einem unlöslichen in sehr geringer Menge als krystallisierbares Produkt das *3,4-Dibrom-1,5-thioxal-bis-benzidin*[1]) (VI) zu erhalten, das sich mit weiterem Dialdehyd zum *Bis-[3,4-dibrom-2,5-thioxal]-benzidin* (VII) umsetzen ließ. Damit ist für diesen Körper die dimolekulare Ringform bewiesen.

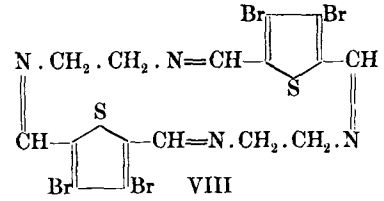


VI

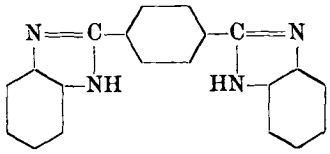
VII

[1]) Bezüglich der Bezeichnungen „Thioxal" und „Xylal" vgl. A. **540**, 2. Anm. (1939).

Für die übrigen Stoffe ergibt sich die analoge Konstitution aus den analogen Eigenschaften. Mit Benzidin ließ sich auch Isophtalaldehyd zum *Bis-[m-xylal]-benzidin* umsetzen. Mit Äthylendiamin erhielt man das *Bis-[3,4-dibrom-2,5-thioxal]-äthylendiamin* (VIII) und das entsprechende *Bis-[p-xylal]-äthylendiamin.*

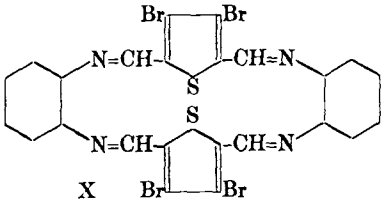


VIII

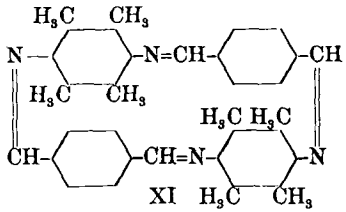


IX

Während bei der Reaktion zwischen Terephtalaldehyd und o-Phenylendiamin das primär entstehende Di-[o-aminoanil] durch spontane Oxydation in *1,4-Di-[2-benzimidazolyl]-benzol* (IX) überging, entstand mit dem Dibromthiophen-dialdehyd außer dem analogen *3,4-Dibrom-2,5-di-[2-benzimidazolyl]-thiophen* das *Bis-[3,4-dibrom-2,5-thioxal]-o-phenylendiamin* (X). Ebenso ließ sich die analoge m-Phenylendiaminverbindung erhalten. Kondensationen mit Diaminodurol



X

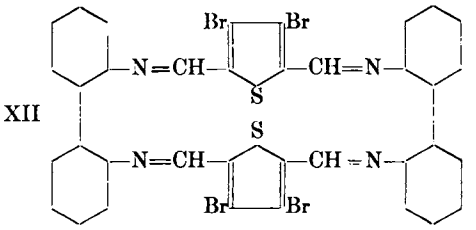


XI

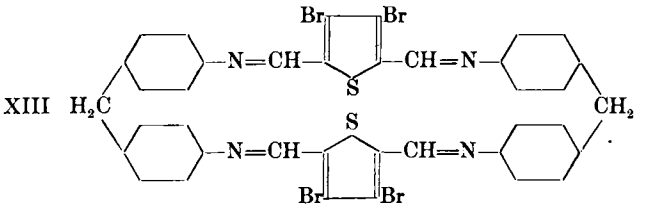
wurden in der — vergeblichen — Hoffnung auf molekularlösliche Körper versucht. Erhalten wurden dabei das *Bis-[p-xylal]-diaminodurol* (XI) und die analoge m-Verbindung. Das entsprechende Derivat des Dibromthiophendialdehyds entstand auch als ziegelroter Körper, aber nicht ganz rein.

Durch seine kolloide Löslichkeit zeichnete sich auch das *Bis-[3,4-dibrom-2,5-thioxal]-2,2'-diamino-diphenyl* (XII) aus. Schließlich bereitete auch die Darstellung eines noch größeren Ringes, des *Bis-[3,4-dibrom-2,5-thioxal]-4,4'-diamino-diphenylmethans* (XIII) und des analogen Terephtalaldehydderivates keinerlei Schwierigkeiten.

XII



XIII



Alle diese Verbindungen sind gefärbt; da sie nicht wie II und III fortlaufende konjugierte Doppelbindungen haben, schwächer als diese, bräunlich bis orange bzw. ziegelrot, und zwar wieder die des Dibromthiophen-dialdehyds am tiefsten. In konz. Schwefelsäure lösen sich fast alle mit charakteristischen Halochromieerscheinungen. Konz. Salzsäure löst sie nicht, färbt aber die meisten rot bis schwarzbraun. Beim Erhitzen werden sie in die Komponenten gespalten. Mit Ausnahme von X und XII, die bei höherer Temperatur erweichen, sind sie bei 400° noch nicht geschmolzen.

Zuletzt haben wir die 3 Dialdehyde mit Dimethylanilin über die entsprechenden Leuko- und Carbinolbasen in malachitgrün-artige Farbstoffe übergeführt.

Beim o-Phtalaldehyd hat das schon Weitz[1]) getan, allerdings ohne den Farbstoff aus der Lösung zu isolieren. Er fand, daß die Lösung „viel gelbstichiger als das gewöhnliche Malachitgrün, beinahe olivgrün" wäre, doch zeigte das Absorptionsspektrum, „daß es sich noch ganz um einen Farbstoff vom Charakter des Malachitgrüns handelt". Aus Terephtalaldehyd hat Löw[2]) nur halbseitige Reaktion unter Bildung des p-Aldehydo-malachitgrüns erzielt.

Bei der Lösung der 3 Dialdehyde in Dimethylanilin tritt Farbe auf, beim Dibromthiophen-dialdehyd rot, beim Terephtalaldehyd orange und beim Isophtalaldehyd gelb.

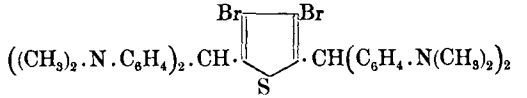
[1]) A. **418**, 12 (1919). [2]) A. **231**, 381 (1885).

Nach Pfeiffer[1]) bilden nicht nur ringförmige Chinone, sondern auch ungesättigte Ketone der Form R.CO.CH=CH.CO.R Chinhydrone, und zwar ist typisch für sie, daß ihre Lösungsfarbe in folgender Reihenfolge der Lösungsmittel zunimmt: Benzol —➤ Anisol —➤ Phenol; Benzol —➤ Anilin —➤ Dimethylanilin; Benzol —➤ Phenol —➤ Dimethylanilin.

Folgende Tabelle zeigt, daß es sich bei den Lösungen der Dialdehyde in Dimethylanilin um typische Chinhydrone handelt; sie zeigt außerdem wieder, daß der bathochrome Effekt vom Dibromthiophen-dialdehyd über den Terephtalaldehyd zum Isophtalaldehyd abnimmt.

Lösungsmittel	Dibromthiophen-dialdehyd	Terephtal-aldehyd	Isophtal-aldehyd
Benzol	farblos	farblos	farblos
Phenol	gelb	schwach gelblich	„
Anisol.	grünlich-gelb	farblos	„
Anilin.	rotorange	intensiv gelb	schwach gelb
Dimethylanilin .	tiefrot	gelborange	intensiv gelb

Bei Anwendung eines genügenden Überschusses von Dimethylanilin läßt sich bei allen 3 Dialdehyden beiderseitige Reaktion erzielen unter Bildung des *3,4-Dibrom-2,5-di-[bis-(p-dimethylamino-phenyl)-methyl]-thiophens* (XIV) bzw. des analogen *1,4-* und *1,3-Di-[bis-(p-dimethylamino-phenyl)-methyl]-benzols*, den Leukobasen der entsprechenden



XIV

Farbstoffe. Mit Chloranil, besser mit Bleidioxyd oder Braunstein in Schwefelsäure bekommt man die Farbstoffe, die sich aber nicht umkrystallisieren und durch Umfällen nicht völlig von anorganischen Bestandteilen befreien lassen, so daß man zweckmäßig erst mit Alkali die Carbinolbasen gewinnt, die man als flockige, graue, unkrystalline Substanzen erhält[2]). Mit verdünnten Säuren bilden sich schon in der

[1]) A. **440**, 241 (1924).

[2]) Die Carbinolbase des aus 2-Thiophenaldehyd erhaltenen Thiophengrüns wurde sogar nur als zähes Öl erhalten. Levi, B. **20**, 514 (1887).

Kälte, schneller in der Wärme, die Farbsalze, die beim Tere- und Isophtalaldehyd grün sind, während das aus Dibromthiophen-dialdehyd über eine grüne Zwischenstufe in Blau übergeht. Wir bezeichnen den Farbstoff daher in Analogie zum Thiophengrün als *Dibrom-thiophenblau.* Mit konz. Mineralsäuren färben sich die Basen tief rot bis orange unter Bildung mehrsäuriger Salze.

Daß in diesem Fall eine hypsochrome Wirkung beim Thiophenderivat einzutreten scheint, ist auffallend. Die blaue Lösungsfarbe scheint aber von einer teilweisen Aggregation herzurühren, wie es das Auftreten eines Tyndallkegels beweist. Die zunächst blaue alkoholische Lösung wird beim Stehen grün und dann optisch leer. Beide Lösungen zeigen die gleichen Absorptionserscheinungen, nämlich ein Maximum bei 646 mμ und ein Nebenmaximum bei 479 mμ. Die Derivate des Iso- und Terephtalaldehyds zeigen ein Hauptmaximum bei 620—622 mμ und ein Nebenmaximum bei 433—434 mμ. Wir haben auch den entsprechenden Farbstoff aus 3,4,5-Tribrom-thiophenaldehyd dargestellt, der sich rein grün löst und optisch sich ganz analog dem aus Dibromthiophendialdehyd verhält. Da auch das Thiophengrün als ausgesprochen gelbgrün gegenüber dem Malachitgrün angegeben wird, zeigt sich doch auch in diesen Fällen der bathochrome Einfluß des Thiophenkernes.

Versuche.

3,4-Dibromthiophen-2,5-diacrylsäure.

10 g 3,4-Dibromthiophen-2,5-dialdehyd werden mit 15 g wasserfreiem Natriumacetat gut verrieben und mit 100 ccm Acetanhydrid $1^1/_2$ Stunden im Ölbad auf 170—175° erhitzt. 75 ccm Acetanhydrid werden abdestilliert, der beim Abkühlen erstarrende Rückstand wird mit einem Brei von 60 g calcinierter Soda und 450 ccm Wasser neutralisiert und dann mit 500 ccm verdünnter Sodalösung ausgekocht. Filtrieren, Filtrat mit Tierkohle kochen und mit Salzsäure die Diacrylsäure ausfällen. Nach Trocknen wird das gelbe Pulver (10,5 g) mit 50 ccm Pyridin extrahiert. Die auskrystallisierende Säure wird noch aus Pyridin–Eisessig 2:3 (auf 3 g 175 ccm) umkrystallisiert. Hellgelbe Nadeln. Ausbeute 50 Proc. d. Th. Schmilzt und zersetzt sich nicht bis 350°. Gut löslich in Pyridin, etwas in Eisessig, kaum in Benzol, Alkohol und Aceton. Sublimiert i. Hochv. bei etwa 220°.

0,1017 g Subst.: 0,1161 g CO_2, 0,0170 g H_2O. — 0,1046 g Subst.: 0,1028 g AgBr.

$C_{10}H_6O_4Br_2S$	Ber.	C 31,41	H 1,57	Br 41,88
	Gef.	„ 31,13	„ 1,87	„ 41,81.

Chlorid. 1 g Säure wird bis zur Lösung mit 15 ccm Thionylchlorid erhitzt, dies abdestilliert, der kräftig gelbe Rückstand aus Aceton umkrystallisiert. Kleine, verfilzte, gelbe Nadeln. Schmelzpunkt 172° (Zers.).

0,1118 g Subst.: 0,0727 g AgCl.

$C_{10}H_4O_2Cl_2Br_2S$ Ber. Cl 16,92 Gef. Cl 16,09.

3,4-Dibromthiophen-2,5-dialdehyd-dianil.

95° heiße Lösungen von 3 g Dibromthiophen-dialdehyd in 150 ccm und 5 g Anilin in 50 ccm Eisessig lassen beim Zusammengeben sofort kleine, gelbe Blättchen fallen. Nach dem Abkühlen mit Alkohol waschen und aus viel Benzol umkrystallisieren. Hellgelbe, glänzende Blättchen. Schmelzpunkt bei schnellem Erhitzen bei 245°, sonst beginnt bei 225° Zersetzung. Löslich in Pyridin, schwer in Benzol, etwas in Eisessig, kaum in Alkohol und Äther.

0,1201 g Subst.: 0,2117 g CO_2, 0,0300 g H_2O. — 0,0906 g Subst.: 0,0760 g AgBr.

$C_{18}H_{12}Br_2N_2S$	Ber.	C 48,21	H 2,68	Br 35,71
	Gef.	„ 48,07	„ 2,80	„ 35,70.

3,4-Dibromthiophen-2,5-dialdehyd-di-[o-oxyanil].

Heiße Lösungen von je 2 g Dibromthiophen-dialdehyd und o-Aminophenol in je 80 ccm Eisessig zusammengeben und kurz kochen. Wie oben aufarbeiten und aus Benzol-Alkohol 2 : 1 umkrystallisieren. Glänzende, orangefarbene Nadeln. Schmelzp. 214° (Zers.). Löslich in verdünntem Alkali mit roter Farbe, ferner in Aceton, Eisessig, Chloroform, Pyridin, kaum in Alkohol.

0,1630 g Subst.: 0,2700 g CO_2, 0,0397 g H_2O. — 0,1131 g Subst.: 5,72 ccm N (18°, 739 mm). — 0,0976 g Subst.: 0,0763 g AgBr.

$C_{18}H_{12}O_2Br_2N_2S$	Ber.	C 45,00	H 2,50	N 5,83	Br 33,33
	Gef.	„ 45,18	„ 2,73	„ 5,72	„ 33,27.

3,4-Dibrom-2,5-bis-[β-chinolyl-(2)-äthylen]-thiophen (I).

5 g Dibromthiophen-dialdehyd, 10 ccm Chinaldin und 50 ccm Acetanhydrid etwa 15 Minuten kochen. Lösung färbt sich über Gelb und Orange rotbraun, dann fallen gelbe Nadeln. Aufarbeiten wie oben, aus viel Benzol oder wenig Pyridin krystallisieren. Bräunlichgelbe

Nadeln. Schmelzp. 247—249°. Ausbeute 76 Proc. d. Th. Etwas löslich in Aceton, kaum in Alkohol und Äther.

0,1474 g Subst.: 0,3091 g CO_2, 0,0392 g H_2O. — 0,1018 g Subst.: 4,61 ccm N (21,5°, 742 mm). — 0,1162 g Subst.: 0,0799 g AgBr.

$C_{26}H_{16}Br_2N_2S$	Ber.	C 56,93	H 2,92	N 5,11	Br 29,20
	Gef.	„ 57,19	„ 2,98	„ 5,08	„ 29,26.

Das *Di-[hydrochlorid]* entsteht, wenn durch 0,5 g der feinst gepulverten und in 50 ccm Äther suspendierten Substanz 20 Minuten trockner Chlorwasserstoff geleitet, das leuchtend rote Additionsprodukt abgesaugt, mit Äther gewaschen und über Kali, Phosphorpentoxyd und Paraffin i. V. getrocknet wird.

0,1778 g Subst. verbr.: 5,63 ccm $^n/_{10}$-KOH.

$C_{26}H_{18}Cl_2Br_2N_2S$ Ber. Cl 11,43 Gef. Cl 11,23.

m-Bis-[β-chinolyl-(2)-äthylen]-benzol.

2 g Isophtalaldehyd, 4,3 g Chinaldin und 6 ccm Acetanhydrid 25 Minuten kochen. Beim Abkühlen Ausfallendes 2-mal aus viel Alkohol umkrystallisieren. Fast farblose Nadeln, Schmelzp. 180°. Löslich in Aceton, Chloroform, Benzol und Eisessig, in letzterem mit gelber Farbe. Mineralsäuren bilden gelbe Additionsprodukte.

22,50 mg Subst.: 72,23 mg CO_2, 11,04 mg H_2O. — 23,05 mg Subst.: 1,410 ccm N (16°, 742 mm).

$C_{28}H_{20}N_2$	Ber.	C 87,46	H 5,25	N 7,29
	Gef.	„ 87,55	„ 5,49	„ 7,01.

p-Bis-[β-chinolyl-(2)-äthylen]-benzol.

Wie bei der m-Verbindung. Rohprodukt gibt aus Chloroform hellgrünlich-gelbe Nadeln vom Schmelzp. 243°. Löslich in Benzol, in Chloroform mit blauer Fluorescenz, in Eisessig mit oranger Farbe. Wenig löslich in Aceton und Alkohol. Mineralsäuren färben orange.

23,74 mg Subst.: 76,34 mg CO_2, 11,22 mg H_2O. — 19,65 mg Subst.: 1,262 ccm N (16,5°, 745,5 mm).

$C_{28}H_{20}N_2$	Ber.	C 87,46	H 5,25	N 7,29
	Gef.	„ 87,70	„ 5,29	„ 7,37.

Terephtalaldehyd-dianil.

Lösungen von 2 g Terephtalaldehyd in 20 ccm und von 5 ccm Anilin in 4 ccm Eisessig färben sich, bei 100° zusammengegeben, rasch über Orange nach Rotbraun und erstarren beim Erkalten zu hellgelbem Krystallbrei. Aus Alkohol mit Tierkohle umkrystallisieren. Elfenbeinfarbige Nadeln vom Schmelzp. 159°. Löslich in Aceton, Eisessig, Chloroform und Benzol.

18,41 mg Subst.: 57,11 mg CO_2, 9,49 mg H_2O. — 20,18 mg Subst.: 1,720 ccm N (13,5°, 754,5 mm).

$C_{20}H_{16}N_2$	Ber.	C 84,47	H 5,67	N 9,86
	Gef.	„ 84,60	„ 5,77	„ 9,93.

Terephtalaldehyd-di-[o-oxyanil].

2 g Terephtalaldehyd und 3,5 g o-Aminophenol mit 60 ccm Eisessig 15 Minuten kochen. Beim Erkalten ausfallende Krystalle 2-mal aus Benzol mit Tierkohle umkrystallisieren. Gelbe Nädelchen vom Schmelzp. 215°. Löslich in Aceton, Chloroform und Benzol mit grüner Fluorescenz, wenig in Alkohol.

19,11 mg Subst.: 53,43 mg CO_2, 8,98 mg H_2O. — 20,72 mg Subst.: 1,602 ccm N (16,5°, 737 mm).

$C_{20}H_{16}O_2N_2$	Ber.	C 75,92	H 5,10	N 8,86
	Gef.	„ 76,25	„ 5,26	„ 8,78.

5,5'-Dimethyl-2,2'-dithienyl[1]).

87 g 5-Jod-2-thiotolen und 100 g Naturkupfer „C" werden, gut gemischt, unter Rühren im Ölbad unter Kontrolle der Innen- und Außentemperatur erhitzt. Bei etwa 150° (Bad) beginnt die Temperatur innen schneller zu steigen, und bei etwa 170° (innen) setzt eine exotherme Reaktion unter Aufbrodeln, Erstarren und Verfärbung ein, bei der jede äußere Wärmezufuhr zu unterlassen ist. Temperatur steigt bis etwa auf 220°. Man läßt dann noch etwa $^1/_2$ Stunde bei 190—200° stehen, kocht nach dem Erkalten die zerkleinerte Masse mit Alkohol aus und krystallisiert daraus um. Schmelzp. 67°. Ausbeute 75 bis 81 Proc. d. Th.

3,4,3',4'-Tetrabrom-5,5'-dimethyl-2,2'-dithienyl.

Zu einer Lösung von 4,3 g Dimethyl-dithienyl in 7 ccm Schwefelkohlenstoff gibt man tropfenweise 15,5 g Brom in 28 ccm Schwefelkohlenstoff. Es scheiden sich glänzende Blättchen ab. Nach 1 Stunde wird Lösungsmittel verjagt, der gepulverte Rückstand bei 100° getrocknet und aus Benzoesäuremethylester umkrystallisiert. Silbergraue Spieße. Schmelzp. 255°. Ausbeute 93 Proc. d. Th. Unlöslich in Äther, Alkohol, schwer in Benzol.

23,67 mg Subst.: 20,70 mg CO_2, 2,94 mg H_2O. — 0,1031 g Subst.: 0,1514 g AgBr.

$C_{10}H_6Br_4S_2$	Ber.	C 23,54	H 1,19	Br 62,70
	Gef.	„ 23,85	„ 1,39	„ 62,49.

[1]) Steinkopf u. Roch, A. **482**, 260 (1930).

3,4,3',4'-Tetrabrom-5,5'-di-[brommethyl]-2,2'-dithienyl.

4 g gepulvertes Tetrabrom-dimethyl-dithienyl werden mit 4 ccm Brom übergossen und unter Ausschluß von Feuchtigkeit bei etwa 70° 3 Stunden mit einer Quarzquecksilberlampe bestrahlt. Nach 24-stündigem Stehen treibt man überschüssiges Brom mit trocknem Stickstoff bei 80—90° ab. Mit Tierkohle aus Benzoesäuremethylester, dann aus Benzol krystallisieren. Schwach gelber, feinkrystalliner Körper. Schmelzpunkt 210°. Ausbeute 11—15 Proc. d. Th. Löslich in Benzol, unlöslich in Alkohol und Äther.

24,19 mg Subst.: 16,17 mg CO_2, 1,56 mg H_2O.

$C_{10}H_4Br_6S_2$ Ber. C 17,97 H 0,60 Gef. C 18,23 H 0,72.

3,4,3',4'-Tetrachlor-5,5'-dimethyl-2,2'-dithienyl.

In die warme Lösung von 3 g Dimethyl-dithienyl in 15 ccm Eisessig wird Chlor geleitet. Selbsterwärmung. Wenn sich ein Krystallbrei gebildet hat, wird abgekühlt, abgesaugt und mit Eisessig gewaschen. Lieber zu wenig als zu viel Chlor einleiten, da dann leicht verharzte Produkte entstehen. Ausbeute etwa 55 Proc. d. Th. Aus Tetrachlorkohlenstoff verfilzte, fast farblose Nadeln vom Schmelzp. 201°. Leicht löslich in Benzol, schwer in Äther und Alkohol.

21,52 mg Subst.: 28,48 mg CO_2, 3,53 mg H_2O.

$C_{10}H_6Cl_4S_2$ Ber. C 36,14 H 1,82 Gef. C 36,09 H 1,84.

3,4,3',4'-Tetrachlor-5,5'-di-[dichlormethyl]-2,2'-dithienyl.

In eine Lösung von 0,5 g Tetrachlor-dimethyl-dithienyl in 20 ccm Tetrachlorkohlenstoff wird 3 Stunden in der Siedehitze im Sonnenlicht Chlor geleitet. Nach dem Verjagen des Lösungsmittels bleibt dunkles Öl, das krystallin erstarrt. Umkrystallisieren aus Eisessig. Schmelzpunkt 119—120°. Löslich in Äther und Benzol. Ausbeute 55 Proc. d. Th.

21,96 mg Subst.: 20,78 mg CO_2, 6,70 mg H_2O. — 4,172 mg Subst.: 10,110 mg AgCl.

$C_{10}H_2Cl_8S_2$	Ber.	C 25,54	H 0,43	Cl 60,38
	Gef.	„ 25,81	„ 0,34	„ 59,92.

3,4,3',4'-Tetrachlor-2,2'-dithienyl-5,5'-dialdehyd.

0,5 g Tetrachlor-di-[dichlormethyl]-dithienyl werden unter Rühren in 50 ccm Kalkwasser und 0,3 g Calciumcarbonat suspendiert. Um Klumpenbildung zu vermeiden, wird langsam, in 1—2 Stunden, im Ölbad bis zum Sieden erwärmt und dabei 4—5 Stunden gehalten. Dann wird überschüssiges Calciumcarbonat mit verdünnter Salzsäure gelöst, Ungelöstes

abgesaugt, bei 110° getrocknet und im Sublimationsapparat bei 170—200° destilliert. Goldgelbe Krystallnadeln. Schmelzpunkt 179°. Ausbeute etwa 50 Proc. d. Th. Löslich in Benzol, unlöslich in Äther und Alkohol.

15,21 mg Subst.: 18,77 mg CO_2, 1,09 mg H_2O.

$C_{10}H_2Cl_4O_2S_2$ Ber. C 33,33 H 0,57 Gef. C 33,66 H 0,80.

3,4,3',4'-Tetrachlor-2,2'-dithienyl-5,5'-dialdehyd-diazin (III).

Zur siedend heißen Lösung von 0,3 g Dialdehyd in 25 ccm Eisessig werden 0,04 g Hydrazinhydrat, in Eisessig gelöst, gegeben. Der ausfallende dunkelrote Niederschlag wird 4-mal mit je 100 ccm Benzoesäureester ausgekocht und mit Alkohol und Äther gewaschen. Der Körper ist unschmelzbar und unlöslich.

18,36 mg Subst.: 22,74 mg CO_2, 1,48 mg H_2O. — 15,72 mg Subst.: 1,08 ccm N (19°, 735 mm).

$C_{20}H_4Cl_8S_4$	Ber.	C 33,70	H 0,57	N 7,87
	Gef.	„ 33,78	„ 0,90	„ 7,79.

3,4,3',4'-Tetrachlor-5,5'-bis-[β-chinolyl-2-äthylen]-2,2'-dithienyl.

Zur heißen Lösung von 0,1 g des Dialdehyds in 10 ccm Acetanhydrid werden 0,16 g Chinaldin gegeben. Lösung färbt sich orange. Nach 10 Minuten Kochen fällt tieforangefarbener, feinkrystalliner Niederschlag. Nach 30 Minuten Kochen filtrieren. Aus viel Eisessig tieforange Nädelchen. Schmelzp. 284°.

17,34 mg Subst.: 37,16 mg CO_2, 4,43 mg H_2O. — 2,216 mg Subst.: 0,082 ccm N (20,5°, 748 mm).

$C_{30}H_{16}Cl_4N_2S_2$	Ber.	C 58,99	H 2,64	N 4,59
	Gef.	„ 58,44	„ 2,86	„ 4,24.

Bis-[3,4-dibrom-2,5-thioxal]-äthylendiamin (VIII).

Eine heiße Lösung von 2 g 3,4-Dibromthiophen-2,5-dialdehyd in etwa 40 ccm Dioxan wird mit 25 ccm Wasser von Zimmertemperatur versetzt und zu der entstehenden Suspension werden 2,5 ccm Äthylendiamin gegeben. Bald tritt unter Selbsterwärmung Lösung ein. Dann fällt allmählich ein fester Körper. Nach völligem Erkalten wird sofort abgesaugt, auf Ton getrocknet und mit Dioxan

ausgekocht. Ein Teil bleibt ungelöst (A), aus dem Dioxan fällt beim Erkalten wieder ein Teil aus (B). Beide schmelzen nicht und sind jetzt unlöslich in allen Lösungsmitteln. Sie werden 4-mal mit je etwa 100 ccm Benzoesäureester ausgekocht. Schwach bräunliche, amorphe Körper. Konz. Schwefelsäure löst orange, konz. Salzsäure färbt rot.

A. 23,65 mg Subst.: 26,10 mg CO_2, 4,81 mg H_2O. — B. 18,99 mg Subst.: 21,00 mg CO_2, 3,90 mg H_2O. — 19,88 mg Subst.: 1,540 ccm N (15,5°, 757 mm).

$C_{16}H_{12}N_4Br_4S_2$	Ber.	C 29,81		H 1,86		N 8,70
	Gef.	„ 30,10,	30,16	„ 2,28,	2,30	„ 9,05.

Bis-[p-xylal]-äthylendiamin.

0,6 ccm Äthylendiamin in wenig Wasser werden zu einer heißen Lösung von 1,2 g Terephtalaldehyd in 200 ccm Wasser gegeben. Bald fällt ein gelblicher Niederschlag, der mit viel Wasser und dann mehrmals mit Benzoesäureester ausgekocht wird. Nur in siedendem Anilin ziemlich löslich, ohne daraus wieder auszufallen.

22,20 mg Subst.: 61,13 mg CO_2, 12,45 mg H_2O.

$C_{20}H_{20}N_4$	Ber.	C 75,95	H 6,33	Gef.	C 75,10 H 6,28.

1,4-Di-[2-benzimidazolyl]-benzol (IX).

Zur kochenden Lösung von 1 g Terephtalaldehyd in 40 ccm Eisessig ebensolche von 2 g o-Phenylendiamin in 20 ccm Eisessig geben. Farbe schlägt bald in Rotgelb um. $^1/_4$ Stunde auf siedendem Wasserbade erhitzen. Bis zum nächsten Tag fallen schwach gelbliche Krystalle aus, die aus Eisessig fast weiß werden. Ausbeute 0,3 g. Bei 300° unverändert, später Zersetzung.

3,580 mg Subst.: 10,145 mg CO_2, 1,450 mg H_2O.

$C_{20}H_{14}N_4$	Ber.	C 77,42	H 4,52	Gef.	C 77,29 H 4,53.

Mäßig verdünnte Natronlauge löst beim Kochen. Lösung zeigt unter der Quarzquecksilberlampe prachtvolle blaue Fluorescenz. Säure fällt den Körper wieder aus.

3,4-Dibrom-thiophen-2,5-dialdehyd und o-Phenylendiamin.

Zur heißen Lösung von 3 g o-Phenylendiamin in 50 ccm wird rasch eine ebensolche von 2 g des Dialdehyds in 300 ccm Eisessig gegeben. Sofort Farbenumschlag nach Rotbraun. Nach $^1/_4$-stündigem Erhitzen auf dem Wasser-

bade wird heiß filtriert. Unlöslich sind 0,24 g *Bis-[3,4-dibrom-2,5-thioxal]-o-phenylendiamin* (X) als schokoladenbraune Substanz, die mit viel Eisessig ausgekocht und mit Alkohol und Äther gewaschen wird.

Sehr wenig löslich in heißem Benzoesäureester, etwas besser in Tetralin mit braunroter Farbe. Pyridin löst nicht. Konz. Schwefelsäure löst warm mit gelbbrauner Farbe. Sintert bei 230°, zersetzt sich bei 262°.

20,60 mg Subst.: 29,38 mg CO_2, 3,52 mg H_2O. — 20,78 mg Subst.: 1,324 ccm N (18,5°, 740 mm).

$C_{24}H_{12}N_4Br_4S_2$	Ber.	C 38,92	H 1,62	N 7,57
	Gef.	„ 38,90	„ 1,91	„ 7,21.

Das Filtrat davon gibt beim Erkalten gelbliche Krystalle von *3,4-Dibrom-2,5-di-[2-benzimidazolyl]-thiophen* (1,3 g), das aus Pyridin–Wasser umkrystallisiert wird. Blättchen vom Schmelzp. 385°.

Nicht löslich in Amylalkohol, Chloroform, Dioxan, schwer in heißem Tetralin, Benzoesäureester und Eisessig. Die Eisessiglösung zeigt unter der Quarzquecksilberlampe schwache bläulich-grüne Fluorescenz. Natronlauge löst beim Kochen.

19,11 mg Subst.: 31,79 mg CO_2, 4,01 mg H_2O.

$C_{18}H_{10}N_4Br_2S$ Ber. C 45,57 H 2,11 Gef. C 45,37 H 2,35.

Bis-[3,4-dibrom-2,5-thioxal]-m-phenylendiamin.

0,5 g 3,4-Dibromthiophen-2,5-dialdehyd in 150 ccm kochendem Eisessig geben mit 0,2 g m-Phenylendiamin in 20 ccm Eisessig sehr rasch olivbraunen, sehr feinen Niederschlag, der 2-mal mit Benzoesäureester ausgekocht wird. Konz. Schwefelsäure löst wenig mit rosa Farbe.

21,09 mg Subst.: 29,64 mg CO_2, 3,34 mg H_2O. — 21,82 mg Subst.: 1,55 ccm N (20,5°, 744 mm).

$C_{24}H_{12}N_4Br_4S_2$	Ber.	C 38,92	H 1,62	N 7,57
	Gef.	„ 38,33	„ 1,94	„ 8,04.

Bis-[3,4-dibrom-2,5-thioxal]-2,2'-diamino-diphenyl (XII).

0,8 g 3,4-Dibrom-2,5-dialdehyd in 200 ccm und 0,5 g 2,2'-Diamino-diphenyl in 50 ccm siedendem Eisessig geben sofort Gelbfärbung und bald beginnende Trübung. Man läßt 15 Minuten auf siedendem Wasserbad, dann über Nacht stehen. Der feine, gelbe Niederschlag wird mit viel Eisessig

ausgekocht und aus benzolischer Lösung mit Benzin (Siedepunkt 60—70°) ausgefällt. Beginnt bei 220° weich zu werden, färbt sich rot und ist bei etwa 230° zähflüssig.

Löst sich leicht in kaltem Chloroform und heißem Dioxan, Pyridin, Benzol und Benzoesäureester. Aceton, Alkohol und Eisessig lösen nicht. Campher löst, gibt aber keine Schmelzpunktsdepression. Konz. Schwefelsäure löst rot, konz. Salzsäure färbt rot.

23,66 mg Subst.: 41,22 mg CO_2, 4,78 mg H_2O. — 25,02 mg Subst.: 1,240 ccm N (20°, 746 mm).

$C_{36}H_{20}N_4Br_4S_2$	Ber.	C 48,43	H 2,24	N 6,28
	Gef.	„ 47,51	„ 2,26	„ 5,62.

Bis-[m-xylal]-diaminodurol.

Je 0,25 g Isophtalaldehyd und Diaminodurol in 30 ccm heißem Alkohol werden zusammen einige Zeit gekocht. Über Nacht fällt dann gelber Körper aus, der aus heißem Benzoesäureester amorph herauskommt. Löst sich auch leicht in heißem Nitrobenzol, ziemlich in Pyridin, sehr wenig in Benzol und nicht in Eisessig. Lösung in Campher gibt keine Schmelzpunktsdepression. Konz. Schwefelsäure löst langsam und fast farblos.

3,798 mg Subst.: 11,360 mg CO_2, 2,335 mg H_2O.

$C_{36}H_{36}N_4$	Ber.	C 82,40	H 6,87	Gef.	C 81,58	H 6,88.

Bis-[p-xylal]-diaminodurol (XI).

Wie oben aus je 0,8 g Terephtalaldehyd und Diaminodurol in 100 ccm Alkohol. Aus der roten Lösung fällt in geringer Ausbeute rotorangefarbener Körper, der nach dem Auskochen mit viel Eisessig braungelb ist. In der Hitze in Eisessig kaum, in Pyridin und Benzoesäureester sehr schwer löslich.

18,19 mg Subst.: 54,57 mg CO_2, 11,19 mg H_2O.

$C_{36}H_{36}N_4$	Ber.	C 82,40	H 6,87	Gef.	C 81,82	H 6,88.

3,4-Dibromthiophen-2,5-dialdehyd und Benzidin.

Konz. heiße Lösungen von 0,5 g Dialdehyd und 1,2 g Benzidin kocht man, bis aus der dunkelroten Lösung ein fester Körper auszufallen beginnt. Nach dem Erkalten wird abgesaugt und 2-mal mit je etwa 100 ccm Benzoesäureester ausgekocht. Beim Erkalten fallen daraus 0,15 g eines gelbbraunen, mikrokrystallinen Körpers. Das *3,4-Dibrom-2,5-thioxal-bis-[benzidin]* (VI) wird aus sehr viel Benzoesäureester

umkrystallisiert. Braungoldene Mikrokrystalle, die bei 450° noch nicht schmelzen. Konz. Schwefelsäure löst weinrot.

4,291 mg Subst.: 9,000 mg CO_2, 1,345 mg H_2O.

$C_{30}H_{22}N_4Br_2S$ Ber. C 57,14 H 3,49 Gef. C 57,20 H 3,51.

Zu einer filtrierten, kochenden Lösung von 0,09 g des Körpers in 200 ccm Benzoesäureester wird eine solche von 0,04 g Dibromthiophen-dialdehyd in 25 ccm Eisessig gegeben und 20 Minuten zum schwachen Sieden erhitzt. Allmähliche Ausscheidung eines amorphen Körpers, der heiß abfiltriert und mit viel Benzoesäureester ausgekocht wird. Das *Bis-[3,4-dibrom-2,5-thioxal]-benzidin* (VII) ist ein brauner Körper, der sich in konz. Schwefelsäure mit violettstichigem Blau löst. Salzsäure färbt schwarzbraun.

3,223 mg Subst.: 5,855 mg CO_2, 0,740 mg H_2O. — 2,351 mg Subst.: 0,127 ccm N (23°, 748 mm).

$C_{36}H_{20}Br_4N_4S_2$ Ber. C 48,43 H 2,24 N 6,28
Gef. „ 49,54 „ 2,57 „ 6,13.

Bis-[m-xylal]-benzidin.

Heiße Lösungen von 1,3 g Isophtalaldehyd in 100 ccm und 2 g Benzidin in 50 ccm Eisessig geben sehr rasch hellgrünlichen Niederschlag, der mit Eisessig und Benzoesäureester ausgekocht wird. Helloliv. Konz. Schwefelsäure löst gelb, konz. Salzsäure färbt braunorange.

20,68 mg Subst.: 63,86 mg CO_2, 9,33 mg H_2O. — 21,03 mg Subst.: 1,930 ccm N (18,5°, 738 mm).

$C_{40}H_{28}N_4$ Ber. C 85,11 H 4,97 N 9,93
Gef. „ 84,22 „ 5,05 „ 10,37.

Bis-[3,4-dibrom-2,5-thioxal]-4,4'-diamino-diphenylmethan (XIII).

0,8 g 3,4-Dibromthiophen-2,5-dialdehyd in 200 und 0,5 g p-Diamino-diphenylmethan in 50 ccm heißem Eisessig werden zusammengegeben. Sofortige Farbvertiefung; rasch Ausfallen eines gelben Körpers. Man erhitzt $^1/_4$ Stunde auf siedendem Wasserbad. Dann kocht man 3-mal mit viel Pyridin und 6-mal mit je etwa 100 ccm Benzoesäureester aus. Leuchtend gelber Körper. 1 g.

22,83 mg Subst.: 40,35 mg CO_2, 4,89 mg H_2O. — 21,14 mg Subst.: 1,240 ccm N (18,5°, 748 mm).

$C_{38}H_{24}N_4Br_4S_2$	Ber.	C 49,56	H 2,61	N 6,09
	Gef.	„ 48,20	„ 2,40	„ 6,72.

Bis-[p-xylal]-4,4'-diamino-diphenylmethan.

Wie oben aus 0,6 g Terephtalaldehyd und 1 g Diamino-diphenylmethan in Eisessig. Mit Eisessig und Benzoesäureester auskochen. Gelblich-weißer Körper. Konz. Schwefelsäure färbt rot und löst gelb; konz. Salzsäure färbt ziegelrot.

26,41 mg Subst.: 82,04 mg CO_2, 12,74 mg H_2O. — 21,80 mg Subst.: 1,908 ccm N (19°, 739 mm).

$C_{42}H_{32}N_4$	Ber.	C 85,14	H 5,41	N 9,45
	Gef.	„ 84,72	„ 5,40	„ 9,87.

3,4-Dibromthiophen-2,5-dialdehyd-di-[p-acetamino-anil] (V).

Je 0,5 g Dibromthiophen-dialdehyd und Acetyl-p-phenylendiamin in je 100 ccm Eisessig werden einige Minuten zusammen gekocht, bis sich in der Hitze fester Körper abzuscheiden beginnt. Nach Erkalten absaugen, in 100 ccm kochendem Pyridin lösen und heißes Wasser bis zur beginnenden Trübung zusetzen. Gelbe, verfilzte, fadenförmige Krystalle. Konz. Schwefelsäure löst gelbrot; beim Eingießen der Lösung in Wasser Spaltung in die Komponenten. Konz. Salzsäure färbt schwarzbraun. Zersetzt sich über 300°. Unlöslich in Aceton, Alkohol, Toluol, kaum löslich in Eisessig, sehr schwer in Benzoesäureester und etwas leichter in Pyridin.

20,39 mg Subst.: 34,84 mg CO_2, 6,03 mg H_2O.

$C_{22}H_{18}O_2N_4Br_2S$ Ber. C 46,97 H 3,20 Gef. C 46,60 H 3,31.

Terephtalaldehyd-di-[p-acetamino-anil].

1,5 g Acetyl-p-phenylendiamin in 100, 0,6 g Terephtalaldehyd in 50 ccm Eisessig; auf dem Wasserbade $^1/_2$ Stunde erhitzen. Ausfallende Krystalle vermehren sich beim Erkalten. Aus Eisessig hellgelbe, glänzende Blättchen. Schmelzp. 320—322°. Nicht löslich in Äther, Alkohol und Amylalkohol, schwer in heißem Eisessig und sehr schwer in Pyridin. Konz. Schwefelsäure löst intensiv gelb, konz. Salzsäure färbt orange.

20,61 mg Subst.: 54,98 mg CO_2, 10,24 mg H_2O.

$C_{24}H_{22}O_2N_4$ Ber. C 72,36 H 5,53 Gef. C 72,75 H 5,56.

3,4-Dibrom-2,5-di-[bis-(p-dimethylamino-phenyl)-methyl]-thiophen XIV). (*Leukobase des Dibromthiophenblaus.*)

3 g 3,4-Dibromthiophen-2,5-dialdehyd in 15 g Dimethylanilin werden mit 8 g wasserfreiem Chlorzink 3 Stunden

unter Rühren auf 110—120° erhitzt. Die zuerst rote Lösung färbt sich grün. Nach dem Erkalten macht man natronalkalisch und treibt das Dimethylanilin mit Wasserdampf ab. Hierauf filtriert man, löst den Rückstand in verdünnter Salzsäure, filtriert nochmals und fällt die Leukobase mit verdünntem Ammoniak aus. Durch Erwärmen wird der Niederschlag filtrierbar gemacht, abgesaugt und gut mit Wasser gewaschen. Aus Benzol farbloses Krystallpulver. Ausbeute 6 g. Zur Weiterverarbeitung ist die Base so genügend rein. Zur Analyse wurde nochmals aus wäßrigem Pyridin umkrystallisiert. Schmelzp. 246°. Löslich auch in Aceton und Benzoesäureester, nicht in Alkohol, Äther und Benzin.

26,78 mg Subst.: 60,36 mg CO_2, 14,01 mg H_2O. — 21,93 mg Subst.: 1,510 ccm N (17°, 736 mm).

$C_{38}H_{42}N_4Br_2S$	Ber.	C 61,14	H 5,63	N 7,50
	Gef.	„ 61,47	„ 5,85	„ 7,79.

Die Carbinolbase des 3,4-Dibrom-thiophenblaus.

Eine mit 400 ccm Wasser verdünnte Lösung von 4 g der Leukobase in 20 ccm verdünnter Schwefelsäure wird mit 6 g fein gepulvertem Braunstein $^1/_2$ Stunde unter häufigem Umrühren stehen gelassen. Filtrieren, Filtrat ammoniakalisch machen, ausgeschiedenen Niederschlag sich absetzen lassen, absaugen, trocknen und zerreiben. 2-mal mit je 30 ccm Benzol auskochen und aus der rotbraunen Lösung nach Filtrieren die Base mit Benzin (Siedep. 60—70°) ausfällen. Nochmals aus Benzol-Benzin umfällen. Amorphes, schwach braunes Pulver mit unscharfem Schmelzpunkt von etwa 180—185°, vorher Sintern. Löslich in Benzol und Äther. Färbt sich mit Alkohol grün. Mit verdünnter Säure bildet sich nach einiger Zeit, schneller beim Erwärmen der Farbstoff.

22,82 mg Subst.: 48,71 mg CO_2, 10,74 mg H_2O. — 24,59 mg Subst.: 1,500 ccm N (16°, 745 mm).

$C_{38}H_{42}O_2N_4Br_2S$	Ber.	C 58,61	H 5,40	N 7,20
	Gef.	„ 58,21	„ 5,27	„ 7,02.

Dibrom-thiophenblau.

Zu einer Lösung von 1 g Carbinolbase in Benzol werden 0,3 g konz. Schwefelsäure in 50 ccm Alkohol gegeben. Man erwärmt auf dem Wasserbad. Durch etwa 100 ccm Äther

wird der Farbstoff als Bisulfat ausgefällt. Nochmals Umfällen aus Alkohol mit Äther. Violettbraune Krystalle, die mit blauvioletter Farbe in Wasser, Alkohol, Amylalkohol und Pyridin löslich und in Benzol, Benzin und Äther unlöslich sind. Die pyridinische Lösung wird nach längerem Stehen entfärbt, die alkoholische und amylalkoholische färben sich grün.

21,64 mg Subst.: 38,21 mg CO_2, 8,84 mg H_2O. — 18,42 mg Subst.: 0,980 ccm N (19°, 748 mm).

$C_{38}H_{40}N_4Br_2S.(HSO_4)_2$	Ber.	C 48,61	H 4,48	N 5,97
	Gef.	„ 48,17	„ 4,57	„ 6,07.

1,4-Di-[bis-(p-dimethylamino-phenyl)-methyl]-benzol.

Aus 2 g Terephtalaldehyd in 20 g Dimethylanilin und 8 g Chlorzink wie bei der Leukobase des Thiophenblaus. Man krystallisiert das Rohprodukt aus Pyridin mit etwas Wasser um. Farblose Krystalle; färben sich an der Luft allmählich grün. Ausbeute 6 g. Schmelzpunkt 244—245° (Zers.). Löslich in Benzol, Pyridin und Aceton, unlöslich in Alkohol und Benzin.

23,96 mg Subst.: 72,62 mg CO_2, 16,73 mg H_2O. — 22,94 mg Subst.: 1,900 ccm N (15°, 746 mm).

$C_{40}H_{46}N_4$	Ber.	C 82,47	H 7,90	N 9,62
	Gef.	„ 82,66	„ 7,81	„ 9,57.

1,4-Di-[bis-(p-dimethylamino-phenyl)-oxymethyl]-benzol.

Aus 3 g Leukobase in 20 ccm verdünnter Schwefelsäure und 500 ccm Wasser mit 6 g Braunstein wie bei der Carbinolbase des Dibrom-thiophenblaus. Nach dem Umfällen schwach graues Produkt vom unscharfen Schmelzp. 160—165°. Löslich in Benzol und Äther, nicht in Benzin.

17,47 mg Subst.: 49,91 mg CO_2, 11,43 mg H_2O. — 17,82 mg Subst.: 1,450 ccm N (16°, 745 mm).

$C_{40}H_{46}O_2N_4$	Ber.	C 78,18	H 7,49	N 9,12
	Gef.	„ 77,92	„ 7,32	„ 9,35.

Das Farbsalz entsteht als Bisulfat aus 1 g Carbinolbase in wenig Benzol mit 0,35 g konz. Schwefelsäure in 50 ccm Alkohol wie oben. 2-mal mit Äther aus Alkohol umfällen. Violettes Pulver, das in kompakten Stücken bräunlichen Oberflächenglanz zeigt. Löslich mit blaugrüner Farbe in Wasser, Alkohol und Pyridin, schwer in Aceton und Chloroform, unlöslich in Benzol und Benzin.

20,08 mg Subst.: 45,93 mg CO_2, 10,52 mg H_2O. — 21,49 mg Subst.: 1,360 ccm N (15,5°, 736 mm).

$C_{40}H_{44}N_4.(HSO_4)_2$	Ber.	C 62,02	H 5,94	N 7,24
	Gef.	„ 62,38	„ 5,86	„ 7,22.

1,3-Di-[bis-(p-dimethylamino-phenyl)-methyl]-benzol.

Aus 2 g Isophtalaldehyd in 20 g Dimethylanilin und 8 g Chlorzink 4 Stunden auf 90—100°, sonst wie oben. Das mit Ammoniak zunächst schmierig ausfallende Rohprodukt wird durch 2-maliges Lösen in heißem Aceton und Zugabe von Wasser bis zur beginnenden Trübung und dann durch Umkrystallisieren aus Benzin (Siedep. 100—110°) gereinigt, wobei man die Konzentration so wählt, daß sich die Base erst bei etwa 50° abzuscheiden beginnt, da sie sonst ölig ausfällt und schlecht krystallisiert. Schmelzp. 147—149°. Ausbeute 3 g. Löslich in Benzol, Pyridin, Aceton, schwer in Äther, Alkohol und Benzin.

23,88 mg Subst.: 71,89 mg CO_2, 16,83 mg H_2O. — 21,15 mg Subst.: 1,760 ccm N (15°, 746 mm).

$C_{40}H_{46}N_4$	Ber.	C 82,47	H 7,90	N 9,62
	Gef.	„ 82,11	„ 7,89	„ 9,60.

1,3-Di-[bis-(p-dimethylamino-phenyl)-oxymethyl]-benzol.

Darstellung genau wie bei der isomeren Carbinolbase. Ebenfalls graues, amorphes Pulver, unscharf nach vorherigem Sintern bei 135 bis 140° schmelzend. Löslich in Benzol, nicht in Benzin.

19,26 mg Subst.: 55,32 mg CO_2, 12,51 mg H_2O. — 19,62 mg Subst.: 1,520 ccm N (15°, 740 mm).

$C_{40}H_{46}O_2N_4$	Ber.	C 78,18	H 7,49	N 9,12
	Gef.	„ 78,33	„ 7,27	„ 8,88.

Das Farbsalz entsteht als Bisulfat wie bei dem Isomeren. Es besitzt die gleichen Eigenschaften.

19,07 mg Subst.: 43,11 mg CO_2, 10,39 mg H_2O. — 20,01 mg Subst.: 1,240 ccm N (15°, 736 mm). — 47,12 mg Subst.: 27,65 mg $BaSO_4$.

$C_{40}H_{44}N_4.(HSO_4)_2$	Ber.	C 62,02	H 5,94	N 7,24	S 8,27
	Gef.	„ 61,65	„ 6,10	„ 7,07	„ 8,06.

Di-[p-dimethylamino-phenyl]-[2-(3,4,5-tribromthienyl)]-methan (Leukobase des Tribrom-thiophengrüns).

2 g 3,4,5-Tribromthiophen-2-aldehyd[1]) werden mit 15 g Dimethylanilin und 8 g Chlorzink 2 Stunden auf 110—120°

[1]) Steinkopf, A. **513**, 292 (1934).

erhitzt. Die gelbe Lösung färbt sich bald grün. Aufarbeitung wie oben. Das eventuell schmierige Rohprodukt wird aus heißem Aceton und Wasser bis zur beginnenden Trübung gereinigt und aus Alkohol umkrystallisiert. Nadeln vom Schmelzp. 159—160°. Ausbeute 2 g. Löslich in Äther, Aceton, Benzin, Pyridin.

21,39 mg Subst.: 34,72 mg CO_2, 7,12 mg H_2O. — 19,12 mg Subst.: 0,870 ccm N (18°, 739 mm).

$C_{21}H_{21}N_2Br_3S$	Ber.	C 43,98	H 3,67	N 4,89
	Gef.	„ 44,27	„ 3,72	„ 5,13.

Tribromthiophengrün.

Aus 1 g Leukobase in 10 ccm verdünnter Schwefelsäure und 150 ccm Wasser mit 3 g Braunstein wie oben. Die mit Ammoniak abgeschiedene Base wird mit Benzol ausgekocht und nach dem Filtrieren mit Benzin (Siedep. 60—70°) gefällt. 0,5 g davon werden in wenig Benzol mit 0,1 g Schwefelsäure in 50 ccm Alkohol wie oben erwärmt, der Farbstoff mit Äther gefällt und aus Alkohol und Äther umgefällt.

Grünes Pulver, löslich in Wasser, Alkohol, Pyridin, schwer in Aceton, nicht in Benzol und Äther.

24,96 mg Subst.: 34,13 mg CO_2, 7,35 mg H_2O.

$C_{21}H_{20}N_2Br_3S.(HSO_4)_2$	Ber.	C 37,67	H 3,14
	Gef.	„ 37,29	„ 3,30.

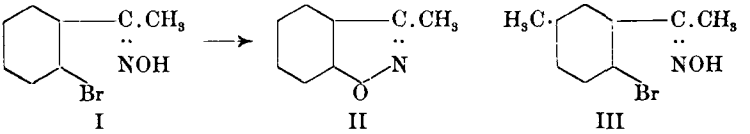
Zur Kenntnis der Benzisoxazole. III[1]);

von *Walther Borsche* und *Wilhelm Scriba*.

[Aus dem Organ.-chemischen Institut der Universität Frankfurt a. M.]

(Eingelaufen am 26. August 1939.)

Viktor Meyer, der Entdecker der Benzisoxazole, war der Meinung, daß sich ihr Ringsystem aus den Oximen o-acylierter Halogenbenzole oder o-acylierter Nitrobenzole durch Alkali nur bilden könne, wenn das Radikal $C_6H_4X.C(:NOH)$. mit einer negativen Gruppe verbunden wäre. Denn das Oxim des o-Bromacetophenons (I) „zeige nach Versuchen von Claus[2]) diese Reaktion nicht, sei vielmehr der Abspaltung von HBr nicht fähig, die ja sonst zu einem Methylindoxazen (II) führen müßte“[3]). Dabei ist ihm allerdings ein kleiner Irrtum unterlaufen. Claus hat seine Versuche nämlich nicht mit dem Oxim des o-Brom-acetophenons, sondern mit „3-Acetyl-4-brom-toluol-oxim“ (III) durchgeführt.



I II III

Für die Folgerung, auf die es Viktor Meyer ankam, ist dieser Irrtum natürlich ohne Bedeutung. Er hat aber bewirkt, daß die Einwirkung von Alkalilauge auf o-Bromacetophenon-oxim bis heute noch nicht untersucht worden ist. Wenigstens haben wir im Schrifttum keinerlei Angaben darüber gefunden. Wir haben deshalb den Versuch selbst durchgeführt, nicht nur zur Ergänzung des bereits vorliegenden Beobachtungsmaterials, sondern vor allem, weil wir — wie sich herausgestellt hat, mit Recht — die Angaben von Claus für unzutreffend hielten.

[1]) II. Abhandlung: A. **540**, 83 (1939).

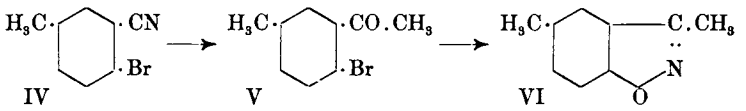
[2]) J. pr. (2), **46**, 26 (1892).

[3]) W. R. Cathcart jun. u. Viktor Meyer, B. **25**, 3291 (1892).

Unsere diesbezüglichen Versuche wurden uns sehr erleichtert dadurch, daß wir über ein *Verfahren zur Darstellung von Alkyl-o-bromaryl-ketonen* verfügten, das sie in recht guter Ausbeute und im Gegensatz zu den bisher üblichen Methoden vollkommen frei von Isomeren liefert. Es besteht in der Umsetzung von o-Brom-benzonitril, das seinerseits von der Anthranilsäure aus leicht zugänglich ist, mit Alkyl-Mg-halogeniden. Die naheliegende Befürchtung, daß der reaktivierende Einfluß des .CN ausreichen würde, um die Umsetzung zwischen den Reaktionspartnern in andre Richtung zu lenken entsprechend der Gleichung:

$$CN.C_6H_4.Br + Hlg.MgAlk = CN.C_6H_4.Alk + Hlg.MgBr$$

hat sich weder in diesem Fall noch bei 2-Chlor-benzonitril bestätigt, wohl aber bei 2-Jod-benzonitril, dessen Grignardierung im übrigen sehr wenig glatt verläuft. Auch in andrer Beziehung sind der Gewinnung von o-Halogen-acetophenonen aus o-Halogen-benzonitrilen und Alkyl-Mg-halogeniden anscheinend gewisse Grenzen gezogen, mit deren genauer Feststellung wir noch beschäftigt sind. Nach unseren bisherigen Beobachtungen reagiert o-Brom-benzonitril unter Ketimin- bzw. Ketonbildung mit Äthyl-Mg-bromid und Benzyl-Mg-chlorid ebenso glatt wie mit Methyl-Mg-jodid, dagegen nicht mit Isopropyl- und Isobutyl-Mg-bromid. Wir haben unser Verfahren ferner auf 3-Cyan-4-brom-toluol (IV) angewandt und durch Umsetzung mit Methyl-Mg-jodid daraus vollkommen reines 3-Acetyl-4-brom-toluol (V) erhalten:



Die Oxime aller dieser in o-Stellung zum Acyl bromierter Ketone verwandeln sich beim Erhitzen mit Alkalilauge in die entsprechenden Indoxazene, von denen 3-Methyl-indoxazen und 3,5-Dimethyl-indoxazen bereits auf anderem Wege von Lindemann und Thiele bzw. von Lindemann und Pickert dargestellt worden sind[1]). Ihre Angaben über

[1]) A. **449**, 77 (1926); **456**, 279 (1927).

die Eigenschaften beider Stoffe decken sich mit unseren Befunden. Daraus ergibt sich, daß Viktor Meyers eingangs erwähnte Annahme nicht zutrifft. 3-Alkyl-indoxazene können aus den zugehörigen o-bromierten Ketoximen auf dieselbe Weise gewonnen werden wie 3-Aryl-indoxazene und Indoxazen-3-carbonsäuren.

Auf welche Umstände die davon abweichenden Angaben von Claus über das Verhalten von „3-Aceto-4-brom-toluol-oxim" gegen Alkalilauge zurückzuführen sind, ist nicht ohne weiteres zu übersehen. Sicher ist jedenfalls, daß sie sich nicht auf das von uns benutzte Ausgangsmaterial beziehen, sondern auf ein anderes Acetyl-4-brom-toluol-oxim, da die Schmelzpunkte beider Stoffe um mehr als 20° auseinanderliegen. Ob es sich aber bei dem Clausschen Oxim um das zum Ringschluß nicht fähige Raumisomere des unsrigen gehandelt hat oder doch um das Oxim des 2-Acetyl-4-brom-toluols, obgleich Claus diese Möglichkeit ausgeschlossen zu haben glaubt, könnte nur die Nachprüfung seiner Versuche entscheiden, die wir bei nächster Gelegenheit vornehmen wollen.

Meisenheimer, Zimmermann und v. Kummer haben aus einer Reihe schöner Versuche gefolgert, daß „o-halogensubstituierte Acetophenon-oxime, soweit sie nur in *einer* Form vorliegen, Kernhalogen und Oxim-hydroxyl nicht in Nachbarschaft enthalten, also *syn*-Methylformen sind" und deshalb keine Indoxazene bilden[1]). Wir glauben nicht, daß unsere Beobachtungen dieser Folgerung widersprechen, nehmen vielmehr an, daß die *syn*-Methylformen solcher Oxime in alkalischer Lösung bei den von uns angewandten Temperaturen zunächst in die *anti*-Formen umgelagert werden und erst dann in die Indoxazene übergehen.

Beschreibung der Versuche.

I. 3-Methyl-benzisoxazol (II) aus 2-Brom-acetophenon-oxim (I).

2-Brom-acetophenon. 45,5 g o-Brom-benzonitril[2]) (0,25 Mol) werden in 200 ccm Äther gelöst, unter Umschütteln langsam

[1]) A. **446**, 208 (1926).

[2]) Aus 2-Brom-benzamid durch $^1/_2$-tägiges Kochen mit 3 Mol $SOCl_2$. Ausbeute nahezu quantitativ.

und anfänglich unter Kühlung mit der Grignard-Lösung aus 18,5 g Mg in 300 ccm Äther und 110 g Jodmethyl (0,75 Mol) versetzt und auf dem Wasserbade 20 Stunden in gelindem Sieden erhalten. Danach wird das Reaktionsgemisch mit Eis und 260 ccm 5n-Salzsäure zersetzt und aufgearbeitet wie üblich. Siedep.$_{16\,mm}$ 118—120° (Meisenheimer, Zimmermann und v. Kummer: Siedep.$_{11\,mm}$ 113—114°); Ausbeute etwa 85 Proc. d. Th.

Bei einem Versuch, 2-Brom-benzoesäure-methylester mit Methyl-Mg-jodid (1,2 Mol) zu 2-Brom-acetophenon umzusetzen, erhielten wir neben viel unverändertem Ester nur *Dimethyl-2-bromphenyl-carbinol* $BrC_6H_4.C(.CH_3)_2.OH$. Beide werden durch Verseifung des Esters mit alkoholischer Kalilauge und anschließende Dampfdestillation getrennt. Das Carbinol bildet ein farbloses Öl vom Siedep.$_{16\,mm}$ 128—130°.

4,9 mg Subst.: 8,98 mg CO_2, 2,23 mg H_2O.

$C_9H_{11}OBr$	Ber.	C 50,23	H 5,11
	Gef.	„ 49,98	„ 5,09.

2-Brom-acetophenon-oxim. Man kocht 10 g des Ketons (0,05 Mol) in 35 ccm Methanol 4 Stunden mit 7 g Hydroxylamin-chlorhydrat und spritzt dann mit Wasser aus. Das Oxim fällt dabei sogleich in farblosen Krystallen aus, die nach dem Umkrystallisieren aus Ligroin (Siedep. 120°) bei 129° schmelzen. Ausbeute 8,5 g.

24,8 mg Subst.: 1,41 ccm N (23°, 754 mm).

C_8H_8ONBr Ber. N 6,54 Gef. N 6,50.

3-Methyl-benzisoxazol. 2,14 g des Oxims (0,01 Mol) in 5 ccm Methanol werden mit 1,12 g Ätzkali in 5 ccm Wasser einen Tag lang auf 140—150° erhitzt. Beim Erkalten scheidet sich das Indoxazen aus der wäßrig-alkoholischen Flüssigkeit als rotes Öl ab. Es wird nach dem Verdünnen mit Äther aufgenommen, siedet unter 15 mm von 104—108° und erstarrt in einer Kältemischung zu einer harten, farblosen Krystallmasse[1]). Ausbeute über 1 g (80 Proc. d. Th.).

26,5 mg Subst.: 70,35 mg CO_2, 12,20 mg H_2O.

C_8H_7ON Ber. C 72,18 H 5,26 Gef. C 72,40 H 5,15.

[1]) Lindemann u. Thiele [A. **449**, 77 (1926)]: Siedep.$_{11\,mm}$ 92,5°.

II. Versuche zur Darstellung von 3-Äthyl-benzisoxazol aus 2-Brom-propiophenon

2-Brom-propiophenon entsteht in einer Ausbeute von etwa 90 Proc. d. Th., wenn man 9,1 g o-Brom-benzonitril in 45 ccm Äther wie vorher mit der Grignard-Lösung aus 17 g Bromäthyl und 3,6 g Magnesium reagieren läßt. Es bildet ein gelbliches Öl vom Siedep.$_{16\ mm}$ 135—140°. Sein *2,4-Dinitrophenyl-hydrazon* krystallisiert aus Alkohol in orangegelben Prismen, die sich bei 115—116° verflüssigen.

21,05 mg Subst.: 2,6 ccm N (23°, 759 mm).

$C_{15}H_{13}O_4N_4Br$ Ber. N 14,25 Gef. N 14,23.

2-Brom-propiophenon-oxim. 4,26 g des Ketons wurden in 42 ccm Methanol mit 2,8 g Hydroxylamin-chlorhydrat und 4 g K-Acetat 2 Tage gekocht. Dann wurde mit Wasser verdünnt und das ölig ausfallende Oxim mit Äther aufgenommen. Es besaß den Siedep.$_{16\ mm}$ 164—172°, war aber noch durch nicht umgesetztes Keton verunreinigt, denn es enthielt zu wenig Stickstoff (5,03 Proc. statt 6,14 Proc.) und löste sich nicht klar in 2n-Natronlauge. Die Lösung konnte jedoch durch $^1/_2$-tägiges Schütteln mit Tierkohle vollkommen geklärt werden. Das daraus zurückgewonnene Oxim, ein farbloses, schweres Öl, kochte bei derselben Temperatur wie vorher. Im Eisschrank begann das Destillat nach einigen Tagen zu krystallisieren, war aber auch nach monatelangem Aufbewahren nur zum Teil erstarrt.

19,4 mg Subst.: 1,0 ccm N (24°, 752 mm).

$C_9H_{10}ONBr$ Ber. N 6,14 Gef. N 5,86.

1,14 g dieses Oxims wurden mit 0,56 g Ätzkali in 5,6 ccm 50-proc. Methanol 9 Stunden auf 120° erhitzt. Das wie üblich isolierte und durch Destillation i. V. gereinigte Reaktionsprodukt, ein farbloses, auch in einer Kältemischung nicht erstarrendes Öl (in der Mutterlauge davon war reichlich Br′ vorhanden!), war seinem N-Gehalt nach (C_9H_9ON Ber. N 9,52, Gef. N 7,76) ein Gemisch von Äthylindoxazen und nicht angegriffenem bzw. zum Übergang in das Indoxazen nicht fähigem Oxim.

III. 3-Benzyl-benzisoxazol aus 2-Bromphenyl-benzyl-keton.

2-Bromphenyl-benzyl-keton. 18,2 g o-Brom-benzonitril (0,1 Mol) in 80 ccm Äther werden 10 Stunden mit der Grignard-Lösung aus 33 g Benzylchlorid gekocht und wie üblich weiter verarbeitet. Das Keton, ein farbloses, dünnflüssiges Öl, siedet bei 15 mm von 206—208°. Ausbeute etwa 12 g. Sein *2,4-Dinitrophenyl-hydrazon* krystallisiert aus Eisessig in orangefarbenen Nädelchen vom Schmelzp. 149°.

8,4 mg Subst.: 0,91 ccm N (25°, 761 mm).

$C_{20}H_{15}O_4N_4Br$ Ber. N 12,31 Gef. N 12,38.

2-Bromphenyl-benzyl-ketoxim. Es entsteht sehr glatt bei 1-tägigem Kochen von 13,8 g des Ketons (0,05 Mol) in 100 ccm Methanol mit 7 g Hydroxylamin-chlorhydrat und 10 g K-Acetat. Die ätherische Lösung des Rohproduktes wird weitgehend eingeengt und dann durch Impfen zur Krystallisation gebracht. Nach wiederholtem Umlösen aus Ligroin (Siedep. 120°) farblose Krystalle von bleibendem Schmelzp. 116°.

25,0 mg Subst.: 1,08 ccm N (22°, 756 mm).

$C_{14}H_{12}ONBr$ Ber. N 4,83 Gef. N 4,96.

3-Benzyl-benzisoxazol. 2,9 g des Oxims (0,01 Mol) werden mit der üblichen Menge wäßrig-methanolischer Kalilauge 8 Stunden auf 110 bis 115° erhitzt. Das Indoxazen scheidet sich beim Erkalten des Rohrs in farblosen Prismen aus. Ausbeute etwa 85 Proc. d. Th. Es schmilzt nach dem Umkrystallisieren aus Methanol bei 87°.

4,986 mg Subst.: 14,620 mg CO_2, 2,430 mg H_2O. — 18,6 mg Subst.: 1,08 ccm N (24°, 758 mm).

$C_{14}H_{11}ON$	Ber.	C 80,38	H 5,26	N 6,70
	Gef.	„ 79,98	„ 5,45	„ 6,64.

IV. 3,5-Dimethyl-benzisoxazol (VI) aus 3-Acetyl-4-brom-toluol (V).

3-Nitro-4-brom-toluol. 30,4 g 4-Amino-3-nitro-toluol (0,2 Mol) werden unter Erwärmen in 42 g Schwefelsäure gelöst. Die Lösung wird mit 210 g Eis verrührt, mit 15 g Nitrit in 45 ccm Wasser diazotiert, nötigenfalls filtriert und in dünnem Strahl in eine 40° warme Aufschwemmung von Cu_2Br_2 (aus 25 g Cu-Vitriol und 68 g Bromnatrium in 200 ccm Wasser durch Erwärmen mit 6,3 g Cu-Bronze) eingetragen. Das Gemisch erhitzt man bis zum Aufhören der N_2-Entwicklung auf dem Wasserbade. Dann wird das Nitro-brom-toluol im Dampfstrom abdestilliert. Es siedet i. V. (17 mm) bei 146—152°, erstarrt beim Abkühlen und schmilzt danach bei 33°. Ausbeute etwa 30 g.

3-Amino-4-brom-toluol. In ein Gemisch aus 5 g Nitro-brom-toluol, 15,5 ccm rauchender Salzsäure und 0,5 g Graphitpulver werden anteilsweise unter kräftigem Umschütteln 8,25 g Sn-Pulver (aus einer Sn-Chlorürlösung durch Zn gefällt) eingetragen, indem man den Verlauf der Reduktion durch Wasserkühlung nach Bedarf mäßigt. Dann läßt man 1 Stunde unter häufigem Umschütteln stehen, macht alkalisch und bläst das Amin mit Wasserdampf ab. Es erstarrt in der Vorlage und verflüssigt sich nach dem Trocknen im Exsiccator bei 34—35°. Ausbeute 75—80 Proc. d. Th.

3-Cyan-4-brom-toluol. Aus 6,2 g des Amins ($^1/_{30}$ Mol) unter den üblichen Bedingungen[1]). Das Nitril wird im Dampfstrom aus dem Reaktionsgemisch abgeblasen, mit Äther aufgenommen, mit verdünnter Natronlauge gewaschen usw. Rohausbeute etwa 70 Proc. d. Th. Aus verdünntem Methanol farblose Nadeln vom Schmelzp. 65°.

3,917 mg Subst.: 7,015 mg CO_2, 1,100 mg H_2O. — 11,78 mg Subst.: 0,775 ccm N (22°, 747 mm).

C_8H_6NBr	Ber.	C 49,00	H 3,06	N 7,14
	Gef.	„ 48,84	„ 3,14	„ 7,40.

3-Acetyl-4-brom-toluol. 6,5 g des Nitrils ($^1/_{30}$ Mol) in 36 ccm Äther werden mit einer Grignard-Lösung aus 2,4 g Mg-Spänen, 39 ccm Äther und 13,5 g Jodmethyl durch 1-tägiges Kochen umgesetzt und wie oben weiter verarbeitet. Ausbeute an Keton etwa 4,3 g, farbloses Öl vom Siedep.$_{15\ mm}$ 132—136°. Sein *2,4-Dinitrophenyl-hydrazon* krystallisiert aus Eisessig in orangefarbenen Nädelchen, die bei 170° schmelzen.

8,2 mg Subst.: 1,00 ccm N (20°, 741 mm).

$C_{15}H_{13}O_4N_4Br$ Ber. N 14,25 Gef. N 14,03.

3-Acetyl-4-brom-toluol-oxim. Man kocht 4,6 g des Ketons (0,02 Mol) in 40 ccm Methanol 6 Stunden mit 2,8 g Hydroxylamin-chlorhydrat. Danach fällt bei vorsichtigem Zusatz von Wasser das Oxim in farblosen Kryställchen aus, die nach mehrfachem Umlösen aus wenig Methanol bei 131—132° schmelzen.

17,6 mg Subst.: 0,92 ccm N (21°, 739 mm).

$C_9H_{10}ONBr$ Ber. N 6,14 Gef. N 5,91.

3,5-Dimethyl-benzisoxazol. Aus 2,28 g des Oxims, die wir in 5 ccm Methanol gelöst und mit 5 ccm 4 n-Kalilauge 9 Stunden auf 150° erhitzt hatten, erhielten wir nach 2-maliger Destillation des Rohproduktes 0,57 g des Indoxazens als farbloses, bei 0° nicht erstarrendes Öl vom Siedep.$_{14\ mm}$ 116—118°[2]). Auch das *Mono-nitro-derivat* daraus (aus Methanol hellgelbe Nadeln vom Schmelzp. 72°) entsprach in seinen Eigenschaften den Angaben von Lindemann und Thiele.

7,4 mg Subst.: 0,96 ccm N (20°, 751 mm).

$C_9H_8O_3N_2$ Ber. N 14,58 Gef. N 14,88.

[1]) Ein Ansatz in ammoniakalischer Lösung nach C. **1930**, II, 2053 gab sehr schlechte Ausbeute an Nitril.

[2]) Lindemann u. Thiele, a. a. O.: Siedep.$_{13\ mm}$ 116°.

V. Sonstige Versuche.

2-Chlor-acetophenon aus 2-Chlor-benzonitril.

Der Versuch wurde von Herrn Dr. O. Vorbach mit 6,4 g 2-Chlorbenzonitril (aus 2-Chlorbenzamid durch Kochen mit Thionylchlorid) in derselben Weise wie für die Bromverbindung angegeben durchgeführt. Es lieferte 4 g Keton vom Siedep. 220—222°.

2,4-Dinitrophenyl-hydrazon. Dunkelgelbe Blättchen vom Schmelzpunkt 206° (aus Essigester).

14,0 mg Subst.: 2,05 ccm N (23°, 758 mm).

$C_{14}H_{11}O_4N_4Cl$ Ber. N 16,76 Gef. N 16,84.

Semikarbazon. Farblose Kryställchen vom Schmelzp. 178—179° [aus Methanol[1])].

12,5 mg Subst.: 2,16 ccm N (23°, 758 mm).

$C_9H_{10}ON_3Cl$ Ber. N 19,97 Gef. N 19,87.

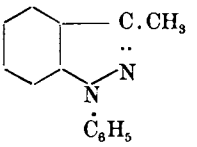
2-Cinnamoyl-brom-benzol, $C_6H_4Br.CO.CH:CH.C_6H_5$.

Zu einem Gemisch aus 10 g 2-Brom-acetophenon (0,05 Mol), 6 g Benzaldehyd und 16 ccm Methanol tropften wir unter Kühlung und Umschütteln 5 ccm 10-proc. Natronlauge. Dabei färbte es sich braun, trübte sich nach einigen Minuten plötzlich und schied allmählich ein schweres Öl ab. Nach 4 Stunden wurde mit Wasser verdünnt, ausgeäthert (die wäßrige Schicht reagierte stark alkalisch und enthielt kein Br'!), über $CaCl_2$ getrocknet und der Ätherrückstand i. V (14 mm) destilliert. Dabei gingen nach einem kleinen Vorlauf von 234—238° 10,5 g Cinnamoyl-2-brom-benzol als zähflüssiges, gelbes, nicht krystallisierendes Öl über. Sein *2,4-Dinitrophenyl-hydrazon* krystallisiert aus Eisessig in roten, bei 236—237° schmelzenden Nadeln. Mit Hydroxylamin konnte weder ein Oxim noch das Indoxazen erhalten werden.

11,8 mg Subst.: 1,25 ccm N (20°, 747 mm).

$C_{21}H_{15}O_4N_4Br$ Ber. N 12,00 Gef. N 12,13.

3-Methyl-1-phenyl-iso-indazol,



3-Methyl-1-phenyl-5-nitro-iso-indazol. 4,88 g 3-Nitro-6-brom-acetophenon (0,02 Mol) wurden mit 4 g Phenylhydrazin-chlorhydrat und 12 ccm

[1]) A. Wahl u. J. Rolland geben 159—160° an (C. 28, II, 1554).

Methanol 18 Stunden auf 150° erhitzt. Nach dem Erkalten bildete der Rohrinhalt eine von einer dunkelbraunen Lösung durchtränkte Krystallmasse. Beim Öffnen des Rohres entwichen unter lebhaftem Aufkochen und weitgehendem Verdampfen der Flüssigkeit reichlich CH_3Cl und CH_3Br. Der Rückstand wurde mit Chloroform herausgelöst nud nach dessen Abtreiben mit 900 ccm Ligroin (Siedep. 120°) ausgekocht, filtriert und vor dem Einsetzen der Krystallisation von anfänglich ausfallendem Harz dekantiert. Ausbeute an Iso-indazol aus zwei Ansätzen 6,2 g. Es krystallisiert aus Ligroin in gelben Nädelchen vom Schmelzp. 131° bis 132°.

8,75 mg Subst.: 1,24 ccm N (21°, 756 mm).

$C_{14}H_{11}O_2N_3$ Ber. N 16,60 Gef. N 16,37.

3-Methyl-1-phenyl-5-amino iso-indazol. 2,53 g des vorigen (0,01 Mol) wurden in 150 ccm Methanol aufgeschwemmt katalytisch reduziert (Pd-tierkohle). Zwei Ansätze wurden nach dem Abfiltrieren des Katalysators vereinigt, eingedampft und der rotbraune Rückstand i. Hochv. destilliert. Dabei ging die Base als gelbliches Harz über, das aus wenig heißem Alkohol in langen, farblosen Nadeln vom Schmelzpunkt 127—128° herauskam. Ausbeute 2,64 g.

8,2 mg Subst.; 1,37 ccm N (22°, 746 mm).

$C_{14}H_{13}N_3$ Ber. N 18,83 Gef. N 18,98.

Der dunkelbraune Destillationsrückstand löste sich nur zum Teil in siedendem Alkohol. Der unlösliche Anteil krystallisierte aus Chloroform–Petroläther (Siedep. 60°) in gelben Nädelchen vom Schmelzp. 336°, in denen nach früheren Beobachtungen ähnlicher Art[1]) vermutlich die dem Methyl-phenyl-nitro-iso-indazol entsprechende *Anoxyverbindung* vorlag.

Die *Benzoylverbindung des Amins* kommt aus heißem Benzol in farblosen Nädelchen vom Schmelzp. 160—161° heraus.

11,6 mg Subst.: 1,30 ccm N (21°, 745 mm).

$C_{21}H_{17}ON_3$ Ber. N 12,84 Gef. N 12,75.

3-Methyl-1-phenyl-iso-indazol. 0,45 g des Amins wurden in 45 ccm Methanol, die 1,5 g Chlorwasserstoff enthielten, gelöst und mit 0,5 g Iso-amylnitrit diazotiert. Nach 5 Stunden fügten wir zu dem Gemisch 1,1 g unterphosphorige Säure. Nach weiteren 16 Stunden wurde es

[1]) W. Borsche u. L. Bütschli, A. 522, 288, Anm. (1936).

stark eingeengt, mit Wasser verdünnt und mit Chloroform ausgezogen. Das von diesem aufgenommene Reaktionsprodukt reinigten wir durch Destillation bei 0,1 mm, bei der es als farbloses, in Eis schnell erstarrendes Öl (0,3 g) überging. Aus Methanol krystallisierte es in farblosen Blättchen vom Schmelzp. 73—74°.

4,82 mg Subst.: 14,27 mg CO_2, 2,57 mg H_2O. — 10,7 mg Subst.: 1,28 ccm N (21°, 750 mm).

$C_{14}H_{12}N_2$	Ber.	C 80,77	H 5,77	N 13,46
	Gef.	„ 80,74	„ 5,96	„ 13,75.

(Abgeschlossen am 14. Oktober 1939.)